

P02 03251

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY** A2

Az apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptidek,
ezeknek megfelelő konkatemér és módosított
peptidek és ezeket tartalmazó vakcina készítmények

Kivonat

A találmány tárgya oltóanyag-készítmény elhízás keze-
lésére. Közelebbről a találmány tárgya apolipoprotein B-100
epitópját utánzó peptid, annak konkatemérje és módosított
peptidje, és az azt tartalmazó oltóanyag.

Készlet

P 0 2 0 3 2 5 1



**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

A 2

**Az apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptidek,
ezeknek megfelelő konkatemér és módosított
peptidek és ezeket tartalmazó vakcina készítmények**

A találmány tárgya oltóanyag-készítmény elhízás kezelésére. Közelebbről a találmány tárgya olyan oltóanyag-készítmény, amely apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptidet, annak konkatemérjeit vagy módosított peptidjeit tartalmazza.

A vérszérum lipidje koleszterinből, trigliceridekből (TG), szabad zsírsavból, foszfolipidból és hasonlókból áll, és a véráramban lipoprotein formájában létezik, amely lipid és apolipoprotein komplexe.

Ezen lipoproteinek közül az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) a TG és koleszterin fő hordozója. A megemelkedett LDL-koleszterin szintek okozta arterioszklerózistól, szívkoszorúér-betegségtől vagy szívinfarktustól szenvedő páciensek száma jelentősen növekedett az étrend változása vagy más tényezők miatt.

Tehát különféle kutatásokat próbáltak meg az LDL-koleszterin csökkentésére és a fenti betegségek okának kiutatására a fenti betegségtől szenvedő páciensek kezelését.



Az LDL-koleszterin - amely a fő etiológiai oka a lipid-anyagcserével kapcsolatos felnőttkori betegségeknek - nagy sűrűségű lipoproteinné (HDL) alakítható makrofágok által. Ezenfelül az LDL-koleszterin más anyagokká is átalakítható, vagy epesavvá alakítható a májban. [Brown, M.S. és Goldstein, J.L., *Annu. Rev. Biochem.* 52, 223-261. old. (1983)].

Az apolipoprotein B-100 az LDL fő fehérje része, és része a nagyon alacsony sűrűségű lipoproteinek (VLDL) és a kilomikronnak is. A vér LDL-koleszterinjé eltávolítható makrofágok fagocitózisa útján abban az esetben, amikor egy ellenanyag a véráramban indukálódik az apolipoprotein B-100 felismerése által, mivel az apolipoprotein B-100 az LDL-részecskék sejtfelszíni LDL-receptorokhoz történő kötődéséhez vezet [Dalum I. és mtsai., *Mol. Immunol.* 34, 1113-1120. old. (1997)].

Abban az esetben, amikor egy makromolekula, mint például ellenanyag hozzákötődött az LDL felszínén lévő apolipoprotein B-100-hoz, lipáz, mint például lipoprotein-lipáz nem képes elhidrolizálni a TG-t és hasonlókat, az apolipoprotein B-100-hoz kötött makromolekula által okozott térbeli gátlás miatt. Ennek következtében a szabad zsírsav kialakulása, ami az elhízás fő tényezője, gátolható ellenanyagok útján, amelyek képesek kötődni az apolipoprotein B-100-hoz.

Mostanában számos, LDL-koleszterin szintjének csökkentésére és arterioszklerózis kialakulásának gátlására szolgáló oltóanyag alkalmazására irányuló kutatást megpróbáltak



különféle állati modellekben, mint például egérben és nyúlban. Például C.R. Alving beszámolt arról, hogy koleszterin módosítható metabolitokkal vagy oxidációja útján, és hogy a módosított koleszterin erős antigénhatású determináns lehet bizonyos esetekben [Alving, C.R. és mtsai., *Biochem. Soc. Trans.* 17, 637-639. old. (1989); Alving, C.R. és mtsai., *J. Lab. Clin. Med.* 127, 40-49. old. (1996); Alving, C.R. és mtsai., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 210, 181-186. old. (1996)].

Ezenkívül beszámoltak arról is, hogy létezik koleszterol elleni endogén ellenanyag a vérszérumban [Wu, J.T., L.L., *Clin. Lab. Med.* 17, 595-604. old. (1997), összefoglalás]. Azt is leközték, hogy abban a kísérletben, amikor nyulakban arterioszklerózist és hiperkoleszterinémiát indukálnak koleszterin-tartalmú táppal történő etetéssel, a hiperkoleszterinémia és arterioszklerózis előfordulása koleszterint tartalmazó liposzómával immunizált nyúlban szuppresszált vagy figyelemreméltóan csökkent a kontroll csoporthoz képest.

Az ilyen, koleszterin-oltóanyaggal indukált ellenanyag immunglobulin M (IgM), amely kötődik a VLDL-hez, a közepes sűrűségű lipoproteinhez (IDL) és az LDL-hez. A fentiek alapján úgy vélik, hogy koleszterin magas szintje által okozott hiperlipoidémia vagy arterioszklerózis kezelésére vagy megelőzésére alkalmas oltóanyag lehetséges [Bailey, J.M., *Science* 264, 1067-1068. old. (1994); Palinski, W. és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 821-825. old.



(1995); Wu, R. és mtsai., *Hypertension* 33, 53-59. old. (1999)].

Az találtuk, hogy az elhízás hatékonyan megelőzhető apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptiddel, és a fentiek alapján oltóanyag-készítményt fejlesztettünk ki elhízás kezelésére.

Tehát a találmány célja apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptid, annak konkatemérjének és módosított peptidjeinek biztosítása.

A találmány egy másik célja eljárás biztosítása a fenti apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptid, annak konkatemérjének és módosított peptidjeinek előállítására.

A találmány egy még másik célja oltóanyag-készítmény biztosítása elhízás kezelésére vagy megelőzésére, amely a fenti apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptidet, annak konkatemérjét és módosított peptidjeit tartalmazza.

A találmány célját apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptid, annak konkatemérjének és módosított peptidjeinek biztosításával érjük el.

Fágok peptidkönyvtár-rendszerét alkalmaztuk a találmány szerint monoklonális ellenanyaghoz (MabB23) kötődő humán apolipoprotein B-100 epitóp szkrínelésére. A fentiek szerint szkrínelt peptidek olyan antigéndeterminánsokhoz szerkezetileg hasonló utánzó peptidek voltak, amelyek felismerhetők az ellenanyag által, és ezen utánzó peptideket a szkrínelt peptid aminosav-szekvenciája szerint szintetizáltuk.



A peptidkönyvtár-rendszer egyfajta eljárás antigéndetermináns háromdimenziós formájának keresésére. Azaz véletlenszerű szekvenciákat kódoló DNS-fragmenseket inzertálunk olyan DNS-ekbe, amelyek fág kis burokkészletét kódolják, és azután a fenti DNS-eket RF-ben (olvasási fázisban) DNS-be inzertáljuk, és *E. coli*-ba transzformáljuk annak érdekében, hogy expresszáltassuk azokat. Az *E. coli* felszínén expresszáladott peptideket antigénnel reagáltatjuk annak érdekében, hogy az antigéndeterminánshoz szerkezetileg hasonló peptidekre szkrínéljünk.

Antiszérum előállítására érdekében egereket immunizáltunk a fenti utánzó peptidek bejuttatásával. Igazoltuk, hogy az így kapott antiszérum felismeri az eredeti apolipoprotein B-100-at, utánzó peptideket és LDL-t [*„Identification of Antigenic Determinants for the Murine Monoclonal Antibodies Against Apolipoprotein A-1 and Apolipoprotein B-100 by using Phage-displayed Random Peptide library”*, Chi-Hoon Kim, Hanyang Univ. (1997)].

A találmány szerinti apolipoprotein B-100 epitópot utánzó peptid az 1., 2. vagy 3. azonosítószámú szekvencia szerinti peptidek, vagy azok keverékének bármelyike lehet.

A találmány szerinti utánzó peptideket konkatemér formában alkalmazhatjuk annak érdekében, hogy javítsuk antigéndetermináns tulajdonságukat. A találmány egy megvalósítási módjaként két vagy több utánzó peptidet kapcsolhatunk össze egymással. Három (3) és tizenöt (15) közötti számú peptidből álló konkatemér kívánatos. Előnyösebben a talál-



mány szerinti konkatemér négy (4) 1. azonosítószám szerinti peptidet tartalmaz.

A fenti utánzó peptid „konkatemérje” alatt olyan polimert értünk, amelyben a fenti peptidek végei össze vannak kötve egymással.

A fenti, találmány szerinti utánzó peptid „módosított peptidje” alatt olyan utánzó peptid variánsokat értünk, amelyek felismerhetők apolipoprotein B-100 elleni monoklonális vagy poliklonális ellenanyag által. Ilyen variánsok a találmány szerinti utánzó peptidek egy vagy több aminosavának szubsztitúcióit, delécióit, addícióit és kémiai szubsztitúcióit tartalmazzák.

A találmány egy még további célja eljárás biztosítása utánzó peptid, annak konkatemérjének és módosított peptidjeinek előállítására, amely szeint: i) a fenti utánzó peptidet, annak konkatemérjét és módosított peptidjeit kódoló DNS-eket inzertálunk vektorba, ii) a fenti vektort gazdas sejtekbe transzformáljuk és azután inkubáljuk azokat, és iii) izoláljuk a fenti utánzó peptidet, annak konkatemérjét és módosított peptidjeit a fenti gazdas sejtekből.

Az oltóanyag-készítmény kisereléseit hagyományos eljárással készíthetjük el a találmány szerinti utánzó peptiddel, annak konkatemérjével és módosított peptidjeivel. A fenti kiserelés előállítási eljárásában előnyösen az adjuvánssal, immunitást erősítő droggal, hordozóval, kötőanyaggal és oldószerrel összekevert vagy hígított készítmény tablettá, pirulá, granulátum, por, tasak, szuszpenzió, emulzió, folyadék, szirup, aeroszol, puha vagy kemény zse-



latinkapszula, injektálásra szolgáló sterilizált folyadék, sterilizált por vagy hasonló bármelyike.

A találmány szerinti készítményben alkalmazható immunológiai adjuváns egyfajta fehérje, amely az alábbiak bármelyikét tartalmazza: T-sejt-epitópot (például hepatitisz B vírus felszíni fehérjéjét), inert hordozót, mint például alumíniumsót, bentonitot, latexet, akrilrészecskét és hasonlót; hidrofób antigént (például lipidet), víz-olaj és olaj-víz emulziót, depóalkotó anyagot (például poliszacharidot), T-sejt-aktivátort, mint például PDP-t, poliadenint, poliuracilt és hasonlókat, B-sejt-aktivátort (például B-sejt mitogént), szulfaktánst, mint például szaponont, lizolecitint, retinált, Quil-A-t, liposzómát és hasonlókat; makrofág aktivitását megerősítő anyagot; és alternatív útvonalon lévő komplement-aktivátorokat, mint például inulint, zimoszánt, endotoxint, lebamizolt, *C. parvum*-ot és hasonlókat.

A találmány szerinti „hordozófehérje” alatt gyógyászati lag elfogadható anyagot értünk, mint például fehérjét vagy alumíniumsót, amely transzportálhatja a találmány szerinti utánzó peptidet, annak konkatemérjét és módosított peptidjeit a véráramon keresztül.

Alumíniumsó, fenoxietil-etanol, víz, fiziológiás sóoldat, laktóz, dextróz, szukróz, szorbitol, mannitol, kalcium-szilikát, cellulóz, metilcellulóz, amorf cellulóz, polivinilpirrolidon, metilhidroxibezoát, propilhidroxibezoát, talkum, magnézium-sztearát és ásványi olaj alkalmazható al-



kalmas hordozóként, kötőanyagként vagy oldószerként a találmány szerinti készítményben.

Ezenfelül a találmány szerinti készítmény továbbá tartalmazhat töltőanyagot, tapadásgátló anyagot, kenőanyagot, nedvesítőszeret, parfümöt, emulgeálószeret és antiszeptikus szeret.

A találmány szerinti készítményt az ezen a területen jól ismert eljárással szerelhetjük ki immunválasz kiváltására emlősben egy (1) vagy több oltás útján.

Az elhízás kezelésére alkalmas találmány szerinti oltóanyag-készítményt különféle utakon keresztül adhatjuk be, mint például orálisan, dermálisan, intradermálisan, vénásan vagy muszkulárisan, előnyösen intradermálisan.

A találmány szerinti oltóanyag-készítmény hatásos dózisa 0,1-10 μg (aktív peptid) per testtömeg-kg, előnyösen 0,5-1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Azonban az oltóanyag-készítmény hatóanyagát számos tényező alapján állapíthatjuk meg, mint például az immunitás, beadási útvonal, páciens állapota, kor, nem, testtömeg, és hasonlók alapján. Tehát a dózis mennyiségének tartománya nem korlátozza a találmány oltalmi körét semmilyen értelemben.

A találmány szerinti oltóanyag-készítmény elsődleges gyógyászati hatása elhízás megelőzése vagy kezelése olyan mechanizmuson keresztül, hogy humán ellenanyag indukálódik az utánczó peptid, annak konkatemérje vagy módosított peptidjei által, kötődik az apolipoprotein B-100 epitópjához az LDL felszínén, és ezáltal térben akadályozza és gátolja



a lipázt zsírsav előállításában, amely az elhízás fő etiológiai tényezője.

Ezenfelül a találmány szerinti oltóanyag-készítmény hatásos hiperlipoidémia szuppresszáására is, olyan mechanizmuson keresztül, hogy LDL detektálódik és könnyedén eltávolítódik makrofágok által opszonizáció útján, amelyet az utánzó peptid, annak konkatemérje vagy módosított peptidjei által indukált humán ellenanyag, és annak kötődése az LDL felszínén lévő apolipoprotein B-100 epitópjához okoz.

A találmány szerinti készítmény egy másik gyógyászati hatása elhízás megelőzése vagy kezelése lipid, mint például koleszterin vagy szabad zsírsav felhalmozódásának gátlás által a sejtben, olyan mechanizmuson keresztül, hogy találmány szerinti utánzó peptid, vagy annak konkatemérje vagy módosított peptidjei által indukált humán ellenanyag kötődik az LDL felszínén lévő apolipoprotein B-100 epitópjához, és megakadályozza az LDL specifikus kötődését a sejt felszínén lévő LDL-receptorhoz.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz tartozó ábrákat:

A találmány fenti célkitűzései és egyéb előnyei nyilvánvalóbbak lehetnek azok előnyös megvalósítási módjainak ismertetése által a mellékelt ábrákra történő hivatkozással, amelyeken:

Az 1.a-1.d ábrákon a találmány szerinti utánzó peptidet expresszázó vektor szerkezetét és készítményeit mutatjuk be. Az 1.a ábrán a vezetőkazetta szerkezetét mutatjuk be, az 1.b ábrán az LB-kazetta szerkezetét mutatjuk be, az



1.c ábrán a BL-kazetta szerkezetét mutatjuk be és az 1.d ábrán a pBX4 expressziós vektor szerkezetét mutatjuk be.

A 2. ábrán a találmány szerinti utánzó peptidet expresszáló pBX1 és pBX4 vektorok előállítási eljárását mutatjuk be.

A 3. ábrán az LB-kazetta azonosítására szolgáló poliakrilamid-gélelektroforézis (PAGE) eredményét mutatjuk be.

A 4. ábrán a pBlue-BL plazmidban lévő BL-kazetta azonosítására szolgáló PAGE eredményét mutatjuk be.

Az 5. ábrán a pBX1 és pBX3 plazmidba inzertált DNS irányítottságát és kópiaszámát igazoló PAGE eredményét mutatjuk be.

A 6. ábrán az expresszált PBl₄-peptid azonosítására szolgáló Western-blot eredményét mutatjuk be.

A 7. ábrán a tisztított PBl₄-peptid igazolására szolgáló nátrium-dodecil-szulfát (SDS) PAGE eredményét mutatjuk be.

A 8. ábrán a tisztított PBl₄-peptid anti-PBl₄-szérum elleni reaktivitásának igazolására szolgáló Western-blot eredményét mutatjuk be.

A 9. ábrán a PBl₄-peptid által indukált egér ellenanyag aviditásának mérésére szolgáló ELISA eredményét mutatjuk be.

A 10. ábrán a PBl₄-peptid egér testtömegének növekedésére gyakorolt szuppresszálo hatását illusztráló grafikont mutatunk be.

A 11.a és 11.b ábrákon azt illusztráló képet mutatunk be, hogy az egerek testtömegének változása függ a találmány



szerinti PBl₄-oltóanyag beadásától 20 héttel hipotalamuszt tönkretévő drog injektálása után.

A 12. ábrán olyan grafikont mutatunk be, amely a PBl₄-oltóanyag injektálása függvényében illusztrálja a vérszérumban lévő lipid koncentrációjára gyakorolt hatást.

Ezt követően a találmányt részletesebben is bemutatjuk. Azonban az alábbi magyarázat csak a találmány megvalósítási módjainak szemléltetését szolgálja, és nem szándékozunk a találmány oltalmi körét korlátozni általuk.

1. példa: oligonukleotid szintézise és anneálása

Az oligonukleotidokat kémiai úton szintetizáltuk a Genemed Synthesis Inc.-nél (San Francisco, CA, USA) az általunk megadott szekvenciák szerint. Az oligonukleotidok 5' végének foszforilálása érdekében 50 µl 100 pmol/µl oligonukleotidot inkubáltunk 10 µl 10 mM ATP-vel, 3 µl 10 U/µl T4-polinukleotid-kinázzal (Takara, Otsu, Japan) és 7 µl 10X kináz-pufferrel két (2) órán keresztül 37°C-on.

A fenti módon foszforilált oligonukleotidok 10 µl-es alikvotjait összekevertük, 80°C-ra melegítettük 5 percre, és azután nagyon lassan lehűtöttük szobahőmérsékletre, ezáltal anneáltuk a specifikus párokat a komplementer szálak között.

2. példa: ligálás

Ligációs elegyet állítottunk elő 1 µl vektor DNS, 5 µl inzert DNS, 1 µl T4-DNS-ligáz (NEB, Beverly, MA, USA), 1 µl 10X enzimreakciós pufferoldat (NEB, Beverly, MA) és 2 µl desztillált víz összekeverésével, és azután inkubáltuk 16°C-on éjszakán keresztül.



3. példa: pBX expressziós vektor konstruálása apolipo- protein B-100 utánzó peptidjének expresszáltatására

1. lépés: a vektor terve

Az utánzó peptid expresszáltatására szolgáló plazmidvektor általában vezetőkazettát és egy vagy több PB1-peptid-gént tartalmaz. Amint az 1. ábrán bemutatjuk, a pBX1-plazmidot, amely egy (1) PB-1-gént tartalmaz, a vezetőkazetta (1.a ábra) klónozásával állítottuk elő a pQE30-plazmid (Qiagen, Hilden, Germany) többszörös klónozó helyén. A kapott plazmidot emésztettük *HindIII* és *SalI* restrikciós enzimekkel, és a kis fragmenst helyettesítettük az LB-kazettával (1.b ábra), megkapva a pBX1-plazmidot, amely alkalmas több BL-kazetta (1.c ábra) könnyű beinzertálására.

Közben a pBluescriptII SK+ plazmidot hasítottuk *SalI* és *XhoI* enzimekkel, és ligáltuk BL-kazettákkal, amelyekben egyetlen vagy több BL-kazetta inzerciója történt meg véletlenszerűen. A PB1-peptid-gének várt ismétléseit a pBlue-BL-plazmidban kiválasztottuk és kivágtuk, és szubklónoztuk pBX1-be (1.d ábra).

2. lépés: PB1-monopeptid expresszáltatására szolgáló vektor előállítás

Vezetőkazettát állítottunk elő a 10. és 11. azonosítószám szerinti szekvenciájú oligonukleotidok anneálásával az 1. és 2. példában leírt eljárások alkalmazásával. Azután a pQE30-vektort (Qiagen, Hilden, Germany), amelyet hasítottunk *SalI* és *BamHI* enzimekkel, összeligáltuk a fenti vezetőkazettával a pQE-vezető plazmid elkészítéséhez. A fenti pQE30-plazmid expresszáltatásának eredményeképpen hat hisz-



tidin-oldalláncot építettünk be pluszban az expresszáltott fehérje N-terminálisára a fehérje könnyű tisztítása érdekében. A fenti vezetőkazettát úgy terveztük, hogy tartalmazzon egy enterokináz felismerő szekvenciát (DDDDKI; 12. azonosítószámú szekvencia) a hozzáadott aminosavak számának minimalizálása érdekében.

Az 1. példa eljárása szerint négy oligonukleotidot, amelyek szekvenciáját a 4-7. azonosítószámú szekvenciákon mutatjuk be, szintetizáltunk, foszforiláltunk, és azután anneáltunk komplementer oligonukleotidokkal az 1.b ábrán bemutatott LB-kazetta (13. és 14. azonosítószámú szekvencia) szintetizálása érdekében. 40 µl anneált oligonukleotidot kevertünk össze 3 µl 1 U/µl T4-DNS-ligázzal, 5 µl 10X enzimpufferrel és 2 µl desztillált vízzel ligációs elegy előállításra. Azután a ligációs elegyet éjszakán keresztül inkubáltuk az oligonukleotidok egymáshoz történő ligálásához.

A reakció befejezése után a reakcióelegyet 20%-os poliakrilamid-gélre vittük fel és elektroforetizáltuk. Az LB-kazettát (52 bp oligonukleotid) (3. ábra) a gél etídiumbromiddal (EtBr) történő festésével azonosítottuk.

A 3. ábrán az M jelű sáv jelzi a 20 bp-létra DNS-t, és az 1. sáv volt a reakcióoldat. Az LB-kazettát QIAX II gélextrakciós reagenskészlet (Qiagen, Hilden, Germany) alkalmazásával állítottuk elő a gélből..

A fenti pEQ30-Vezető plazmidot hasítottuk HindIII és SalI enzimmel, és azután ligáltuk a fenti LB-kazettával a 2. példa leírása szerint, a PBI utánzó peptidet expresszáló



vektor előállítása érdekében. Az előállított expressziós vektort pBX1-nek neveztük el, és a vektorral expresszáltatott peptidet PBl₁-nek neveztük el (2. ábra).

3. lépés: PBl₁-peptid konkatemér expresszáltatására szolgáló vektor előállítása

Az 1. példa eljárása szerint négy oligonukleotidot - amelyek szekvenciáját a 4., 5., 8. és 9. azonosítószámú szekvenciákon mutatjuk be - szintetizáltunk, foszforiláltunk, és azután anneáltunk komplementer oligonukleotidokkal az 1.c ábrán bemutatott BL-kazetta (15. és 16. azonosítószámú szekvencia) szintetizálása érdekében. Azt követően az oligonukleotidokat ligáltuk egymással a 2. lépés eljárása szerint, és azután 20%-os poliakrilamid-gélre vittük fel elektroforézis végett. 55 bp hosszúságú oligonukleotidokat (vezetőkazetta) azonosítottunk a gél EtBr-rel történő festése útján. A BL-kazettát előállítottuk a gélből QIAEX II gélextrakciós reagenskészlet alkalmazásával, és hasítottuk *SalI* and *XhoI* enzimekkel.

Közben pBluescriptII SK plazmidot (Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A) hasítottunk *SalI* és *XhoI* enzimekkel. A vektort 0,8%-os agarózgélen elektroforetizáltuk, és QIAEX II gélextrakciós reagenskészlet (Qiagen, Hilden, Germany) alkalmazásával állítottuk elő.

A 2. példával megegyező ligációs reakciót hajtottunk végre a pBlue-BL-plazmid előállításához, 5 µl BL-kazetta DNS és 1 µl fent hasított vektor DNS alkalmazásával.

A pBlue-BL plazmidot hasítottuk *SalI* és *XhoI* enzimekkel, és a BL-kazettát extraháltuk. A pBX2-plazmidot a BL-



kazettának a 2. példában előállított pBX1-vektor *SalI* helyére történő beinzertálásával állítottuk elő. Ezenfelül a pBX3 és pBX4 vektorokat azon BL-kazetták számának változtatásával állítottuk elő, amelyeket a pBX1-vektor *SalI* helyére inzertáltunk be, kettőről (2) háromra (3) (2. ábra).

A pBX2, pBX3 és pBX4 vektorokról expresszálatott peptidek konkatemérek voltak, amelyek kettő (2) – négy (4) PBl-peptidet tartalmaztak. Ezeket sorrendben PBl₂, PBl₃ és PBl₄ néven neveztük.

4. lépés: Az inzert azonosítása

Gazdasejteket (*E. coli* M15 [pREP4]; Qiagen, Hilden, Germany) transzformáltunk a pBlue-BL-plazmiddal, és 1% agar csészére szélesztettünk, és azután inkubáltunk 37°C-on 16 órán keresztül, hogy *E. coli* kolóniái kialakulhassanak. Az agar csészén kialakult kolóniák egyikét beoltottuk 10 ml LB-tápközegbe és inkubáltuk rázatás mellett 37°C-on tizenhat (16) órán keresztül, és azután a plazmidot izoláltuk DNS-tisztítási rendszer útján (*Wizard PLUS SV DNA miniprep DNA purification system*; Promega, Madison, WI, U.S.A). A transzformált *E. coli*-ből izolált plazmidot inkubáltuk *SalI* és *XhoI* restrikciós enzimekkel, hogy elhasítsuk azokat 37°C-on egy (1) óra alatt, és elemeztük 20% PAGE útján (4. ábra). A 4. ábrán az M jelű sáv jelzi a 20 bp-létra DNS-t, és az 1. sáv jelzi a 3. lépésben kapott oligonukleotid-terméket, a 2. sáv jelzi a 3. lépésben 20% PAGE-vel izolált BL-kazetta DNS-t, és a 3. sáv jelzi a restrikciós enzimmel kezelt rekombináns pBlue-BL-plazmidot. Amint a 4. ábrán be-



mutatjuk, igazoltuk, hogy a pBlue-BL-plazmid tartalmazta a BL-kazettát.

E. coli (M15[pREP4]) sejteket transzformáltunk pBX1 vagy pBX3 plazmiddal, és a plazmid DNS-t izoláltuk a fenti-ek szerint, a DNS-kazetta inzertek számának és irányítottságának igazolása érdekében. Az izolált plazmidot azután hasítottuk *SalI* és *HindIII* restrikciós enzimekkel, és elemeztük 20% PAGE útján (5. ábra). Az 5. ábrán az M jelű sáv jelzi a 20 bp-létra DNS-t, és az 1. és 3. sáv jelzi az LB-kazettát tartalmazó, de a BL-kazettát nem tartalmazó pBX1-plazmidot, a 2. sáv jelzi az egy LB és két BL-kazettát hordozó plazmidot a helyes irányítottságban. Másrészről a 4. sáv jelzi az egy LB és két BL-kazettát tartalmazó plazmidot, azonban fordított irányítottságban. Amint az 5. ábrán bemutatjuk, azt, hogy hány darab B-kazetta (BL vagy LB-kazetta) lett inzertálva, és milyen irányítottságban a pBX-vektorba, azonosíthattuk restrikciós enzimes térképezéssel.

Ezenfelül a transzformált *E. coli*-ból begyűjtött plazmidba beépített B-kazetták DNS-szekvenciájáról igazoltuk, hogy azonos a tervezett szekvenciákkal. A plazmidokat *Wizard PLUS DNA miniprep kit* alkalmazásával állítottuk elő, és *Sequenase (Ver. 2.1) DNA sequencing kit* (Amersham, Cleveland, UK) alkalmazásával szekvenáltuk.

4. példa: PBl₄-peptid expresszáltatása *E. coli*-ban és tisztítása

1. lépés: A PBl₄-peptid expressziójának igazolása

A PBl₄-peptid expressziójának igazolására háromféle transzformált *E. coli* M15[pREP4] törzset tenyésztettünk



ampicillint és kanamicint tartalmazó LB-agar tápközegen. Egy *E. coli* M15[pREP4] törzset pBX4-plazmiddal transzformáltunk, egy másikat vakon transzformáltunk pQE30-cal, és a másik nem transzformált *E. coli* M15[pREP4] volt. Minden, a szilárt tenyészetben kialakult kolóniát folyékony LB-tápközegbe oltottunk, amely 100 µl/ml ampicillint és 25 µl/ml kanamicint tartalmazott, és éjszakán keresztül inkubáltuk. A tenyészetet 37°C-on inkubáltuk egy (1) órán keresztül rázatással, amíg az OD-érték 0,5-0,7-et ért el 600 nm-en. Azt követően 1 mM izopropil-tio-β-galaktopiranozidot (IPTG) adtunk a tenyésztő tápközeghez a rekombináns fehérje expressziójának elősegítésére, és tovább tenyésztettük 37°C-on öt (5) órán keresztül. 1 ml tenyésztő tápközegzet vettünk le, és centrifugáltuk 14000 rpm-en két (2) percig a baktériumsejtek kicsapására. A sejtcsapadékot felfuszpedáltuk 50 µl 2x SDS-oldatban [100 M Tris-Cl pH 6,8, 20% glicerin (w/v), 4% SDS (w/v), 2% 2-merkaptoetanol, 0,001% brómfenolkék] SDS-PAGE-ra történő felvitel végett. A felfuszpendált oldatot 95°C-on hevítettük öt (5) percen keresztül, és azután 10 µl oldatot vittünk fel a megöntött gél zsebébe, és elektroforetizáltuk 20 mA mellett öt (5) órán keresztül (*Mighty Small II*, Hoefer, USA). Az alkalmazott töményítő és elválasztó gél akrilamid koncentrációja sorrendben 5% és 15% volt, és előre festett *SeeBlue* standardot (250 Kda - 4 kDa; NOVEX, San Diego, CA, U.S.A) vagy széles tartományú *Mark12* standardot (200 kDa - 2,5 kDa) alkalmaztunk standard méretű marker fehérjeként. Az elektroforézis után a gélt *Coomassie Brilliant Blue R-250*-nel fes-



tettük egy (1) órán keresztül, és festéktelenítettük festéktelenítő oldattal (5% metanol és 7% ecetsav) tíz (10) órán keresztül.

Annak igazolására, hogy az expresszáldott fehérje a PB1₄-peptid, az elektroforézis-gélben lévő fehérjéket Wester-blottoltuk anti-PB1 nyúl ellenanyag alkalmazásával (6 ábra). Az antiszérumot kémiai úton szintetizált (Bio-Synthesis, Inc., Lewisville, TX, USA), ovalbuminhoz konjugált PB1-peptiddel történő immunizálással állítottuk elő. A 6. ábrán az M jelű sáv jelzi az előre festett SeeBlue standardot, az 1. sáv jelzi a nem transzformált *E. coli* M15 [pREP4] inkubálására alkalmazott tápközeget, a 2. sáv jelzi a pQE30-vektorral transzformált *E. coli* M15 [pREP4] inkubálására alkalmazott tápközeget, a 3. sáv jelzi a pBX4-vektorral transzformált *E. coli* M15 [pREP4] inkubálására alkalmazott tápközeget.

Amint a 6. ábrán bemutatjuk, csak a pBX4-gyel transzformált *E. coli* expresszált rekombináns PB1₄-peptidet, és reprezentált specifikus immunitást az anti-PB1 egérszérummal.

2. lépés: Az expresszált peptid oldhatóságának azonosítása

A pBX4-vektorral transzformált *E. coli* M15 [pREP4] törzset inkubáltunk az 1. lépésben leírt módszerrel. A tenyésztő tápközeg 10 ml-ét levettük és lecentrifugáltuk a sejtek begyűjtésére. A sejtcsapadékot felszuszpendáltuk 5 ml sejtlízis-oldatban (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM imidazol, pH 8,0) a természetes fehérjék kinyerésére a



sejtből. Lehűtés után a felszuszpendált csapadék oldatát szonikáltuk 20 ciklusban ultrahang-hullámokkal a sejtek lizálása érdekében. A felülúszót centrifugálással vettük le, 4°C-on 10000 rpm-mel 30 percen keresztül. Azonos térfogatú 2x SDS-oldatot kevertünk össze az oldattal, és SDS-PAGE-t hajtottunk végre az 1. lépésben leírt módszerrel, miután minden oldatot forraltunk 95°C-on 5 percig. Az SDS-PAGE eredményeképpen igazoltuk, hogy a pB1₄-peptid izolálható és tisztítható az A jelű oldható extraktumból, amennyiben benne volt a B jelű oldhatatlan nyers extraktumban.

3. lépés: pB1₄-peptid tisztítása

3-1. lépés: affinitási kromatográfia

His-címkézett fehérjék tisztítására szolgáló Ni-NTA-gyantát alkalmaztunk az 1. lépésben kapott rekombináns peptid tisztítására. A gyantában telítésben lévő Ni⁺ és az expresszált fehérje végén lévő hisztidin-oldalláncok közötti vonzóhatást alkalmazó affinitási kromatográfia jól ismert eljárás jelentőséggel bíró fehérjék könnyű tisztítására.

Először pBX4-vektorral transzformált *E. coli* M15[pREP4] sejteket oltottunk be 1 L LB tenyésztőtápközegbe, és inkubáltuk 37°C-on éjszakán keresztül 0,6 feletti OD-értékig 600 nm-en. Az LB tenyésztőtápközeg aránya az pBX4-vektorhoz ötven (50) az egyhez (1) volt. IPTG-t adtunk hozzá 1 mM végkoncentrációban, és még további öt (5) órán keresztül inkubáltuk. Az inkubálás után a sejtcsapadékot a tenyésztő tápközeg centrifugálásával állítottuk elő 6000 g-vel 30 percen keresztül, és a csapadékot -70°C-on



tároltuk éjszakán keresztül. A csapadékot jégen felolvasztottuk, és felfuszpendáltuk feloldó-oldatban (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM imidazol, pH 8,0), ahol 5 ml feloldó-oldatot alkalmaztunk a csapadék minden g-jára. A sejteket szonikálással lizáltuk a 2. lépés szerint, és azután centrifugáltuk szobahőmérsékleten, 10000 g-vel 30 percig. A csapadékkal azonos térfogatú puffert (8 M karbamid, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0) adtunk a sejttörmelék felfuszpendálására és az abban lévő fehérjék denaturálására, és a felfuszpendált csapadék-oldatot rövid ultrahanghullámmal kezeltük, hogy több fehérje oldódjon fel a pufferben. A szuszpenziót 8000 rpm-mel 30 percen keresztül centrifugáltuk a sejttörmelék eltávolítására, amely nem szolubilizálódott 8 M karbamidban. A fent előállított felülúszó 4 ml-éhez 1 ml Ni-NTA-gyantát adtunk 4°C-on, és rázattuk 200 rpm-mel 2 órán keresztül a His-címkét tartalmazó fehérjék befogása érdekében.

Az ilyen fehérje/Ni-NTA komplexet tartalmazó felülúszót óvatosan kromatográfiás oszlopba töltöttük [mérete: 2 cm (id) x 2,7 cm (h)]. A felesleges puffert leöntöttük a kupak kinyitásával, miután a gyanta leülepedett. Az oszlopot 20 ml pufferrel mostuk (8 M karbamid, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01M Tris-HCl, pH 8,0) és azt követően 20 ml közepes pH-jú pufferrel (8 M karbamid, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01M Tris-HCl, pH 6,3) a Ni-NTA-gyantához nem specifikusan kötődött fehérjék kimosása érdekében. A His-címkét tartalmazó célfehérjéket 5 ml alacsony pH-jú puffer beöntésével eluáltuk (8 M karbamid, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01M Tris-HCl, pH 5,9) két (2) alka-



lommal, és azt követően 5 ml erősen savas pufferrel (8 M karbamid, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01M Tris-HCl, pH 4,5) négy (4) alkalommal, és azután SDS-PAGE-t alkalmaztunk az eluált célfehérjék azonosítására 15%-os akrilamid-gél alkalmazásával (7. ábra). A 7. ábrán az M jelű sáv jelzi az előre festett SeeBlue méretmarkert, és az 1. sáv jelzi a tisztított PB1_4 -peptidet.

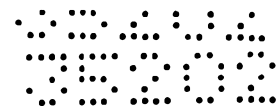
A fent tisztított fehérjéket dializáltuk PBS-sel szemben (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/L Na_2HPO_4 és 0,24 g/L KH_2PO_4), hogy azok visszanyerjék az eredeti konformációjukat. Az alkalmazott dializiscsővek molekulatömeg-vágási mérete 3500 Da volt. A dialízis során 3 L, 2 M karbamidot tartalmazó PBS-t alkalmaztunk az első 5 órában, és azután 5 L, karbamid nélküli PBS-t alkalmaztunk két (2) alkalommal éjszakán keresztül.

3-2. lépés: Hidrofób kromatográfia

Hidrofób kromatográfiát hajtottunk végre a 3-1. lépésben kapott PB1_4 -peptid tisztaságának javítása érdekében.

Ammónium-szulfátot adtunk a 3-1. lépésben a Ni-NTA-gyantáról eluált PB1_4 -peptidet tartalmazó oldathoz 20% végkoncentrációban apránként, és azután a pH-t 7,0-ra állítottuk. Az oldatot három vagy több órán keresztül hagytuk miután 10% ammónium-szulfát teljesen feloldódott, és azután az oldatot *Phenyl-Sepharose*-oszlopra vittük fel [a töltet: *Phenyl Sepharose Fast Flow* gyanta (Pharmacia, Sweden); oszlopméret: 1 cm (id) x 3 cm (h)].

Az összes frakciót, amelyet az oszlopról eluáltunk az eluáló puffer oszlopra történő ráöntésével (8 M karbamid,



0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01M Tris-HCl, pH 6,3) 0,5 ml/perc áramlási sebességgel ammónium-szulfát fordított gradiense mellett 10%-tól 0%-ig, géltre vittük fel SDS-PAGE céljából. A PB1_4 -peptidet tartalmazó frakciót összegyűjtöttük és dializáltuk sótlanítandó pufferoldatba, és egyidejűleg eltávolítottuk a karbamidot, amelyet denaturálószerként alkalmaztunk.

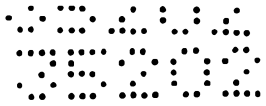
3-3. lépés: A His-címke eltávolítása

2 M karbamidot adtunk pufferoldathoz (50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl_2 , pH 7,4), amely alkalmas a denaturálószer és imidazol, stb. eltávolítására a tisztított His-címkézett fehérje mellől, és az enterokináz aktiválására is. A dializált PB1_4 -peptidet, amelyet a 3-2. lépésben kapunk, ismét dializáltuk a fenti karbamidot tartalmazó puffer alkalmazásával a PB1_4 -peptid sótlanítására, és amely során a karbamid koncentrációját apránként lecsökkentettük ismételt dialízissel karbamid-mentes pufferrel szemben. 3 U/ml enterokinázt adtunk a PB1_4 -peptidet tartalmazó oldathoz, amelynek a pufferét lecseréltük a fenti második pufferre, és 23°C-on inkubáltuk. Az óránként levett oldatot azután SDS-PAGE-val elemeztük a His-címkézett PB1_4 -peptid ($\text{PB1}_4^{\text{His}}$) His-címkéje eltávolításának ellenőrzése érdekében.

3-4. lépés: Ioncserélő kromatográfia

Az enterokinázos kezelés eredményképpen keletkezett nemkívánatos fehérjéket és peptideket ioncserélő kromatográfia útján távolítottuk el.

A 3-3. lépésben kapott $\text{PB1}_4^{\text{His}}$ -peptidet tartalmazó oldatot dializáltuk dialízis-pufferben (2 M karbamid, 0,1 M



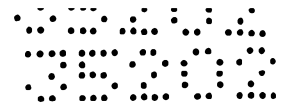
NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,0), és a puffert elégséges módon kicseréltük. A dializált oldatot DEAE-Sepharose gyan-
tára vittük fel (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Azt követően az oszlopot ekvilibráltuk ekvilibrááló pufferrel (50 mM ná-
trium-foszfát puffer, 2 M karbamid, pH 7,0), és a peptidet eluáltuk NaCl koncentráció-gradienssel 0-tól 1 M-ig egy má-
sik puffer alkalmazásával (50 mM nátrium-foszfát puffer, 2 M karbamid, 1 M NaCl) (folyási sebesség: 0,5 ml/perc). Az összes frakciót eltettük, és célfehérjét tartalmazó frakci-
ókat összeöntöttük. A PB1₄^{-his}-peptid jelenlétét SDS-PAGE-
val erősítettük meg a frakciók töményítése után.

4. lépés: PB1₄ mennyiségi meghatározása

A 3. lépéssel azonos eljárással kapott tisztított PB1₄-peptidet mennyiségileg meghatároztuk a *micro BCA reagent* (Pierce, Rockford, USA) alkalmazásával történő elemzés révén.

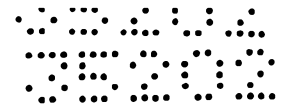
5. lépés: A rekombináns PB1₄-peptid jellemzőinek igazolása

A 3. lépésben megtisztított PB1₄-peptid tisztaságát és antigénként való immunogenitását szintetikus PB1₄-peptid ellen termeltetett antiszérum ellen Western-blot vizsgálati eljárással erősítettük meg ECL (Amersham, Cleveland, UK) alkalmazásával. SDS-PAGE (2. példa, 1. lépés) után a gélt együtt inkubáltuk PVDF-membránnal pufferben (0,3% Tris, 1,5% glicin, 20% metanol) 60 V-os állandó feszültség mel-
lett három (3) órán keresztül a gélben lévő fehérje PVDF-membránra történő átvitele érdekében. Azután a blottolt membránt 5 ml blokkoló oldattal [TBS pH 7,5, 5% fölözött



tejpor (w/v), 0,02% Tween 20] inkubáltuk 1,5 órán keresztül, és azután háromszor mostuk TTBS-ben (0,1% Tween 20-at tartalmazó Tris-pufferelt sóoldat) sorrendben 15 percig, 5 percig és 5 percig. A PB1-peptid elleni antiszérumot (2. példa 1. lépése) TTBS-oldattal hígítottuk egy (1) : ötezer (5000) arányban, és azután inkubáltuk a membránnal 1,5 órán keresztül. A PB1₄-peptid tisztaságának igazolására PB1₄-peptid elleni antiszérumot (3. példa) alkalmaztunk. Miután mostuk a gélt TTBS-sel, sorrendben 15 percig, 5 percig és 5 percig, a membránt 1,5 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten olyan oldattal, amelyben alkalikus foszfáttal jelölt F(ab)'₂-kecske-anti-egér IgG (H+L)-t (Zymed, San Fransisco, CA) hígítottunk TTBS-oldattal egy (1) : egyezer (1000) arányban. A membránt ismét mostuk TTBS-sel háromszor, és azután festettük BCIP/NBT (5-bromo-4-kloro-3-indolil foszfát/nitro blue tetrazolium (Sigma)] hozzáadásával. A BCIP/NBT oldatot TTBS mosással távolítottuk el a festés után. A Western-blot elemzés eredményeképpen az expresszált PB1₄-peptid felismerhető az anti-PB1₄-szérummal.

Az ECL esetében PVDF-membránt (Gelman Science, BioTrace^R) alkalmaztunk nitrocellulóz membrán helyett. Emellett az első ellenanyagot egy (1) : tízezer (10,000) arányban hígítva alkalmaztuk, és HRP-vel konjugált nyúl anti-egér-IgG-t (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.) alkalmaztunk második ellenanyagként egy (1) : tízezer (10,000) arányban hígítva. 1 ml A oldatot alkalmaztunk 25 ml B oldathoz [ECL+Plus western-blot agent (Amersham)] a színreakcióban. Amikor a szín megfelelően kialakult, a membránt filmkazet-



tába helyeztük sorrendben 5, 10, 20 és 30 másodpercre, hogy filmre exponáljuk a gélen lévő csíkok detektálása végett (8. ábra). A 8. ábrán M jelzi az ECL-detektáló jelölőanyagot (Gibco BRL) és az 1. sáv jelzi a PBl₄-peptidet. A 8. ábrán bemutatottak eredményeképpen az expresszált PBl₄-peptid felismerhető az anti-PBl₄-szérummal.

Ezenfelül azon Western-blot elemzés eredménye, amelyben a PBl₄-peptidet nyúlszérumból *Protein-G* oszloppal (Bio-Rad, USA) izolált poliklonális ellenanyag alkalmazásával detektáltuk, azonos eredményt adott.

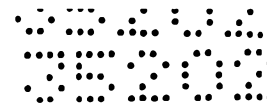
5. példa: Anti-PBl₄-peptid egér ellenanyag előállítása

Az itt alkalmazott PBl₄-peptid a PBl₄^{-his}-peptid volt, amelyről a His-címkét eltávolítottuk a 2. példa 3-3. lépésében.

1. lépés: PBl₄-peptid és OVA ligálása

Hordozófehérjeként ovalbumint (OVA) adtunk a 2. példa 3. lépésében megtisztított PBl₄-peptidhez, egy (1) : tíz (10) mólarányban, és inkubáltuk egy (1) órán keresztül 4°C-on. A PBl₄-peptid-ovalbumin oldathoz azonos térfogatú 2% (v/v) glutáraldehidet adtunk, és inkubáltuk egy (1) órán keresztül folyamatos rázatással. Azután glicint adtunk a reakcióelegyhez a reakció leállítására, amíg a végkoncentrációja 0,2 M lett.

A reakció után a reakcióelegyben megmaradt glutáraldehidet és glicint dialízissel távolítottuk el 12000-14000 MWCO dialízismembrán (Spectrum®, Dominguez, CA, USA) alkalmazásával.



2. lépés. Egér immunizálása

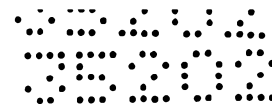
Az 1. lépésben OVA-val kapcsolt peptidet betöményítettük és egér immunizálására alkalmaztuk. Az egérnek beadandó antigén mennyisége 5 μg volt, amely az OVA-kapcsolás előtti PB1₄-peptid mennyisége volt. Az azonos mennyiségű adjuvánssal emulgeált antigént intraperitoneálisan injektáltuk az egérbe 0,2 ml mennyiségben.

Komplett Freund-féle adjuvánst (CFA) alkalmaztunk adjuvánsként az első injekcióban, és inkomplett Freund-féle adjuvánst (IFA) alkalmaztunk adjuvánsként a megerősítő immunizálásban két (2) alkalommal két (2) hét időközzel. Kontroll egérben BSA-t (marhaszérum-albumint) injektáltunk.

Öt (5) nappal az utolsó injekció után 1 ml vért vettünk az egértől szívszűrással, és a vért 30 percig alvasztottuk 37°C-on. Azután a vért lecentrifugáltuk 30 percig 4°C-on 2500 g-vel, és az alvadékot eltávolítottuk a vérből. A felülúszót (azaz vérszérumot) éjszakán keresztül inkubáltuk 4°C-on, hogy a megmaradt vérkoagulánsok teljesen betöményedjenek, és centrifugáltuk 20 percig 10000 g-vel. A kapott felülúszót számos csőbe alikvotoltuk. A kísérletben alkalmazott vérszérumot 4°C-on tároltuk, a maradékot pedig -20°C-on.

3. lépés. Az anti-PB1₄ ellenanyag aviditásának mérése közvetett ELISA-val

Az ellenanyag aviditását a 2. lépésben kapott vérszérummal mértük. 100 μl PB1₄-peptidet osztottunk szét 96-mérőhelyes mikrotiterlemez (Falcon, *Pro-binding*) mérőhelyeibe, és hagytunk 4°C-on 6 órán keresztül vagy tovább, és

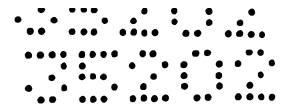


azután mostuk háromszor (3-szor) TTBS-sel (0,05% Tween 20-at tartalmazó Tris-pufferelt sóoldat). 200 µl blokkoló oldatot (1% BSA TTBS-ben) adtunk a mérőhelyekhez, és inkubáltuk 37°C-on egy (1) órán keresztül, és azután mostuk háromszor (3-szor) TTBS-sel. Blokkoló oldatban egy (1) : 10²-10⁵ arányban hígított izolált szérum 100 µl-ét adtuk a reakcióelegyekhez, és inkubáltuk 37°C-on 1 órán keresztül, és azután mostuk háromszor (3-szor) 200 µl TTBS-sel. Blokkoló oldatban egy (1) : 10³ arányban hígított HRP-vel konjugált anti-nyúl-IgG ellenanyag (Pierce, Rockford, IL) 100 µl-ét adtuk a reakcióelegyekhez, és inkubáltuk 37°C-on 1 órán keresztül, és azután mostuk háromszor (3-szor) 200 µl TTBS-sel. A HRP-szubsztrát reagenskészlet (Bio-Rad) A oldatát összekevertük B oldattal kilenc (9) : egy (1) arányban. A kapott elegy 100 µl-ét hozzáadtuk a reakcióelegyhez, és reagáltattuk 30 percen keresztül, és azután a reakcióelegy optikai denzitását mértük 405 nm-en ELISA-leolvasó (EL312e, Bio-Tek Ins.) alkalmazásával (9. ábra). A 9. ábrán igazoltuk, hogy a PB1₄-peptidre specifikus egér ellenanyag alkalmazható Western-blotban és ELISA-ban ezerszeres (1000) hígításban (3,0 az X-tengelyen az ábrán).

6. példa: PB1₄-oltóanyag elhízásellenes hatása egérmoldell alkalmazásával

1. lépés: Elhízás indukálása egérben

5 hetes ICR-egeret (Korea Center for Animal Experiment Ltd., Seoul, Korea) alkalmaztunk. Az egereket tenyésztőtelepen neveltük, ahol a hőmérsékletet 17-25°C-on tartottuk, és kevert táppal etettük (Sam Yang Feed Ltd., Seoul, Korea,

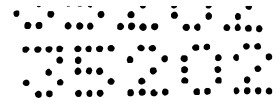


[összetétel: víz 11,8% vagy több, fehérje 20,0% vagy több, nyers lipid 3,0% vagy több, nyers rost 10,0% vagy kevesebb, nyers hamu 10,0% vagy kevesebb, kalcium 0,6% vagy kevesebb és foszfor 0,4% vagy több]). *Goldthiogluco*sé-t (GTG) adtunk az egereknek elhízás indukálására. A GTG-nek szerepe van a ventero-mediális hipotalamikus magok (VMH) deszenzitizálásának indukálásában. Tehát a GTG-t kapott egerek nem érzik magukat jóllakottnak, és állandóan enni kívánnak. Az itt alkalmazott GTG nagyon instabil vegyület, amely könnyen lebomlik vízben, vagy nedvesség hatására. Ezért 100 mg GTG-t (Sigma, Inc.) hígítottunk 1 ml szezámolajban (Sigma, Inc.), és alkalmaztunk azonos módon, mint Brecher és mtsai. [*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 70, 498-501. old. (1949)] a GTG megfelelő mennyiségének beadás érdekében.

Az egereket szétosztottuk tesztcsoportba [húsz (20) egér] és kontroll csoportba [négy (4) egér], és 25 ml GTG-t injektáltunk a tesztcsoportba, míg a kontrollokat semmivel injektáltuk.

A tesztcsoportban lévő egerek testtömegét megmértük a kísérlet előtt, és azokat az egereket szelektáltuk ki és alkalmaztuk a kísérletben, amelyek testtömegének ez eltérése nem volt szignifikáns. Az egerek testtömege egy (1) héttel a GTG-injekció után a 26,5 és 29,5 g közötti tartományban volt.

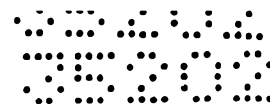
A GTG-vel injektált csoportból 7 egeret indukáltunk elhízásra, míg a többit nem. Az elhízásra nem indukált egereket ismét oltottuk GTG-vel, majd az összes egeret indukáltuk elhízásra.



Az elhízásra indukált egereket három (3) csoportba osztottuk szét. A második GTG-injekció után egy héttel beinjektáltuk a PB1₄-peptidet a hét (7) egérből álló 1-es tesztcsoportba a 3. példa 2. lépése szerinti eljárással. Ezenfelül a három közül egy másik csoport egereit [a hét (7) egeret tartalmazó 2-es tesztcsoport] ovalbuminnal oltottuk be a PB1₄-peptid helyett vak kísérletként, és nem injektáltunk oltóanyagot a másik tesztcsoportba [a hat egeret tartalmazó 3-as tesztcsoport] az elhízás indukálására. Másrészről 0,2 ml PBS-t injektáltunk a kontroll csoportba, hogy összehasonlítsuk a tesztcsoportokkal a találmány szerinti oltóanyag hatásának igazolására.

Ezenfelül az itt alkalmazott tápot tojássárgával kevertük össze és megszáritottuk 50°C-on a koleszterin felvételének indukálására, hogy a koleszterin szintje növekedjen az egerek szérumában. A tápot olyan mennyiségben adtuk, hogy elég legyen koleszterin-szinttel kapcsolatos betegség okozásához. Az egerek testtömegét mindennap megmértük.

Amint a 10. ábrán bemutatjuk, az oltóanyaggal oltott 1-es tesztcsoport (-▲-▲-) testtömege 27,7±0,4 g-ról 52,2±1,7 g-ra növekedett tizenkét (12) hét GTG oltás után. Az adatok azt a következtetést igazolják, hogy nem volt szignifikáns eltérés a testtömeg növekedésében az 1-es tesztcsoport és a kontroll csoport (-○-○-) között a testtömeg növekedésében. Azonban mind a 2-es tesztcsoport (-●-●-), amelynek ovalbumint injektáltunk elhízás után, mind az a tesztcsoport (-■-■-), amelybe nem injektáltunk oltóanyagot az elhízás indukálása után, folyamatosan növekedett



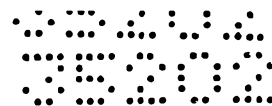
28,3±0,5 g-ról 68,9±2,8 g-ra. Tehát igazoltuk, hogy az elhízás gátolható a PBl₄-peptid-oltóanyag injektálásával.

A 10. ábrán G1 és G2 jelentése a GTG injektálásának az ideje, és V1, V2 és V3 jelentése a PBl₄-peptid-oltóanyag injektálásának ideje.

A 11. ábrán az elhízásra indukált egér kinézetét mutatjuk be. Az 1-es tesztcsoport 20 hetes egerét (11.a ábra: normális egér) hasonlítottuk össze a 3-es tesztcsoport 20 hetes egerével (11.b ábra: elhízott egér). Amint a 11. ábrán bemutatjuk, igazoltuk, hogy a találmány szerinti oltóanyag hatékony volt az elhízás gátlására.

2. lépés: Koleszterin szintjének mérése vérben

Az első GTG-injekció után a kontroll csoportban lévő 12 hetes egér vérkoleszterin szintjét összehasonlítottuk az 1-es és 2-es tesztcsoportban lévő, GTG-vel oltott 12 hetes egerével. Az összkoleszterin, triglicerid, HDL-koleszterin és LDL-koleszterin koncentrációját mértük enzimatis módszerrel *Cholestezyme-V*, *Triglyzyme-V*, *HDL-C555* (Shin Yang Chemicals, Seoul, Korea) és *LDL-EX* (Denka Bio-Research, Ltd., Tokyo, Japan) reagenskészletek alkalmazásával. Minden kísérletben standard görbét vettünk fel az OD-értékekből szokásos *Calibrater-D* (Denka Bio-Research, Ltd., Tokyo, Japan) alkalmazásával a kísérleti hiba csökkentésére. A keszített OD-értéket a kalibrációs görbe alapján számítottuk ki a lipid-tartalom és koncentráció megállapítására, az eredményeket az 1. táblázatban és a 12. ábrán mutatjuk be.



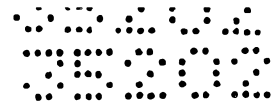
	Összkoleszterin	TG	HDL-C	
Kontroll	79±3,7	180±26	59±3,4	
1-es teszt-csoport	118±3,6	217±47	92±4,7	20±1,7
2-es és 3-as tesztcsoport	131±8,8	218±70	119±7,5	30±4,5
TG: triglicerid, HDL-C: HDL-koleszterin, LDL-C: LDL-koleszterin				

Amint az 1. táblázatban és a 12. ábrán bemutatjuk, a az elhízás indukálásának eredményeképpen igazoltuk, hogy nem volt szignifikáns eltérés a két tesztcsoport és a kontroll koleszterin-szintje között, míg az összkoleszterin, HDL-C és LDL-C teljes vérkoncentrációja kismértékben növekedett (12. ábra).

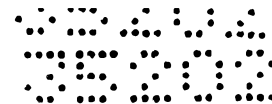
A találmány szerinti oltóanyag-készítmény, amely apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptidet, annak konkátómérjét és módosított peptidjeit tartalmazza, gátolhatja elhízás előfordulását auto-immunitás okozása nélkül a szervezetben.

Tehát az LDL-lel kapcsolatos keringési betegséget hatékonyabban kezelhetjük találmány szerinti oltóanyaggal, mint az ideiglenes jellegű és költséges hagyományos eljárással, amelyben koleszterinnel kapcsolatos anyagcsere-enzimet gátoltak.

Míg a találmányt adott példákkal összefüggésben mutatuk be és írtuk le, a szakember számára nyilvánvaló, hogy



annak alakjában és részleteiben számos változat képzelhető el a találmány oltalmi körétől és szellemétől való eltérés nélkül, amelyet a mellékelt igénypontok definiálnak.



SZEKVENCIALISTA

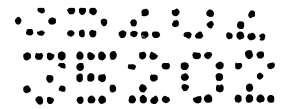
<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia
<220>
<223> apolipoprotein B-100 utánzó peptidje
<400> 1

Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr Trp Ile Ala Phe
1 5 10 15

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia
<220>
<223> apolipoprotein B-100 utánzó peptidje
<400> 2

Arg Phe Arg Gly Leu Ile Ser Leu Ser Gln Val Tyr Leu Asp Pro
1 5 10 15

<210> 3
<211> 15
<212> PRT



<213> Mesterséges szekvencia
<220>
<223> apolipoprotein B-100 utánzó peptidje
<400> 3

Ser Val Cys Gly Cys Pro Val Gly His His Asp Val Val Gly Leu

1 5 10 15

<210> 4
<211> 23
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia
<220>
<223> oligonukleotid BL- vagy LB-kazetta konstruálására
<400> 4

tgcaccgtaa tgttcctcct atc 23

<210> 5
<211> 28
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia
<220>
<223> oligonukleotid BL- vagy LB-kazetta konstruálására
<400> 5

atcattgaag ataggaggaa cattacgg 28



<210> 6
<211> 29
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia
<220>
<223> oligonukleotid LB-kazetta konstruálására
<400> 6

ttcaatgatg tttattggat tgcattcta 29

<210> 7
<211> 24
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia
<220>
<223> oligonukleotid LB-kazetta konstruálására
<400> 7

agcttagaat gcaatccaat aaac 24

<210> 8
<211> 28
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia
<220>
<223> oligonukleotid BL-kazetta konstruálására
<400> 8



ttcaatgatg tttattggat tgcattcc

28

- <210> 9
- <211> 23
- <212> DNS
- <213> Mesterséges szekvencia
- <220>
- <223> oligonukleotid BL-kazetta konstruálására
- <400> 9

tcgaggaatg caatccaata aac

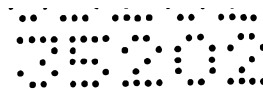
23

- <210> 10
- <211> 24
- <212> DNS
- <213> Mesterséges szekvencia
- <220>
- <223> a vezetőkazetta felső szála
- <400> 10

gatccgatga tgatgacaag atcg

24

- <210> 11
- <211> 24
- <212> DNS
- <213> Mesterséges szekvencia
- <220>
- <223> a vezetőkazetta alsó szála



<400> 11

tcgacgatct tgtcatcatc atcg

24

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> enterokináz-hasítóhely

<400> 12

Asp Asp Asp Asp Lys Ile

1

5

<210> 13

<211> 52

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> LB-kazetta felső szála

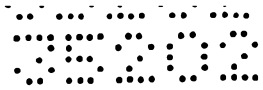
<400> 13

tcgaccgtaa tgttcctcct atcttcaatg atgtttattg gattgcattc ta

52

<210> 14

<211> 52



<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia
<220>
<223> LB-kazetta alsó szála
<400> 14

agcttagaat gcaatccaat aaacatcatt gaagatagga ggaacattac gg

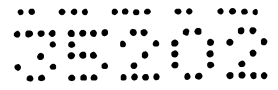
52

<210> 15
<211> 51
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia
<220>
<223> BL-kazetta felső szála
<400> 15

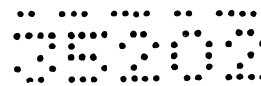
tcgaccgtaa tgttcctcct atcttcaatg atgtttattg gattgcattc c

51

<210> 16
<211> 51
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia
<220>
<223> BL-kazetta alsó szála
<400> 16



tcgaggaatg caatccaata aacatcattg aagataggag gaacattacg g



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Az 1. azonosítószámú szekvenciájú, apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptid és annak konkatemérje.

2. Az 1. igénypont szerinti utánzó peptid, amelynek konkatemérje egy (1) és tizenöt (15) közötti utánzó peptidet tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti utánzó peptid, amelynek konkatemérje négy (4) utánzó peptidet tartalmaz egymás után.

4. Az 1. igénypont szerinti utánzó peptid és annak konkatemérje, amelyben az utánzó peptid aminosav-szekvenciája módosított addíció, deléció vagy kémiai szubsztitúció bármelyikével.

5. Az 2. azonosítószámú szekvenciájú, apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptid.

6. Az 5. igénypont szerinti utánzó peptid, amelynek konkatemérje egy (1) és tizenöt (15) közötti utánzó peptidet tartalmaz.

7. Az 5. igénypont szerinti utánzó peptid, amelynek konkatemérje négy (4) utánzó peptidet tartalmaz egymás után.

8. Az 5. igénypont szerinti utánzó peptid és annak konkatemérje, amelyben az utánzó peptid aminosav-szekvenciája módosított addíció, deléció vagy kémiai szubsztitúció bármelyikével.



9. Az 3. azonosítószámú szekvenciájú, apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptid.

10. Az 9. igénypont szerinti utánzó peptid, amelynek konkatemérje egy (1) és tizenöt (15) közötti utánzó peptidet tartalmaz.

11. Az 9. igénypont szerinti utánzó peptid, amelynek konkatemérje négy (4) utánzó peptidet tartalmaz egymás után.

12. Az 9. igénypont szerinti utánzó peptid és annak konkatemérje, amelyben az utánzó peptid aminosav-szekvenciája módosított addíció, deléció vagy kémiai szubsztitúció bármelyikével.

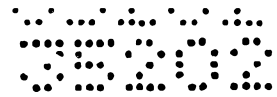
13. Oltóanyag-készítmény elhízás kezelésére, amely az 1., 2. vagy 3. azonosítószámú szekvenciájú, apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptid , vagy annak konkatemérje, módosított peptidjei és keverékei bármelyikét tartalmazza.

14. A 13. igénypont szerinti oltóanyag-készítmény, amelyet intradermális injekcióval adnak be.

15. A 13. igénypont szerinti oltóanyag-készítmény, amelynek a típusa tabletta, pirula, granulátum, tasak, elixír, szuszpenzió, emulzió, oldat, szirup, aeroszol, lággy vagy kemény zselatinkapszula, sterilizált injektálható oldat vagy sterilizált por bármelyike.

16. Eljárás apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptid, annak konkatemérje és módosított peptidjének előállításra, *azzal jellemezve, hogy*

i) az 1., 2. vagy 3. azonosítószámú szekvenciájú, apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptid vagy annak



konkatemerje és módosított peptidje genetikai anyagát kódoló DNS-t inzertálunk vektorba;

ii) gazdasejteket transzformálunk az i) lépésben előállított vektorral, és inkubáljuk azt;

iii) izoláljuk az apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptidet, annak konkatemerjét és módosított peptidjét a gazdasejtéből.

17. DNS, amely négy (4) egymás után kapcsolt, 1. azonosítószámú szekvenciájú, apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptidből álló polipeptidet kódol.

18. Expressziós vektor, amely négy (4) egymás után kapcsolt, 1. azonosítószámú szekvenciájú, apolipoprotein B-100 epitópját utánzó peptidből álló polipeptidet kódoló DNS-fragmenst tartalmaz.

A meghatalmazott:

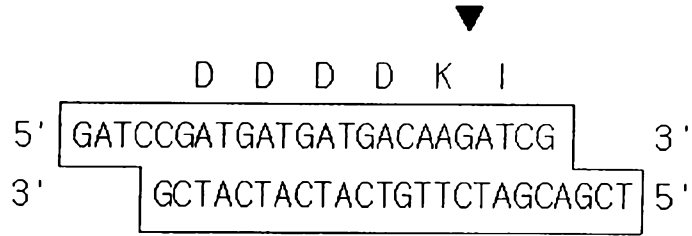
DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

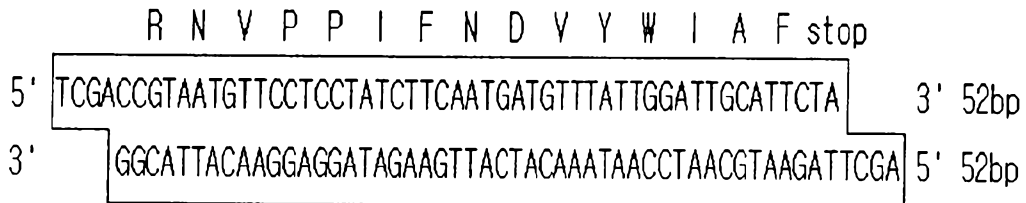
Lengyel Zsolt

szabadalmi ügyvivőjelölt

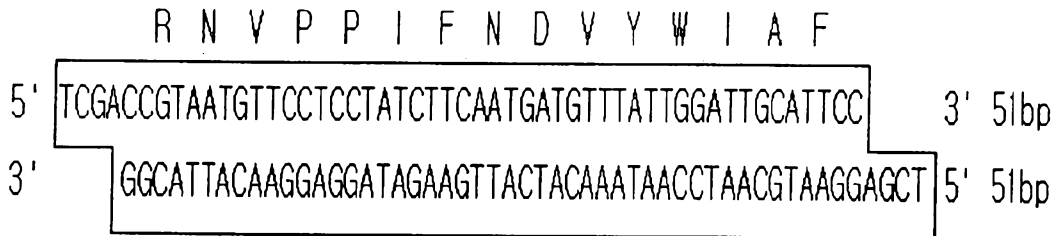
Földi



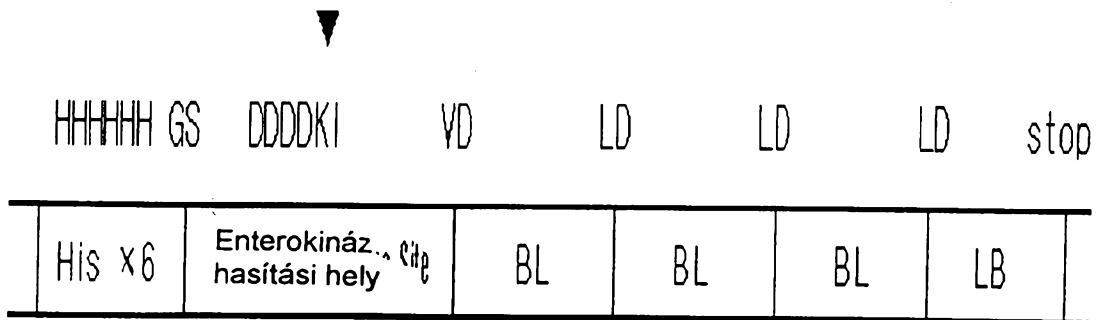
1a ábra



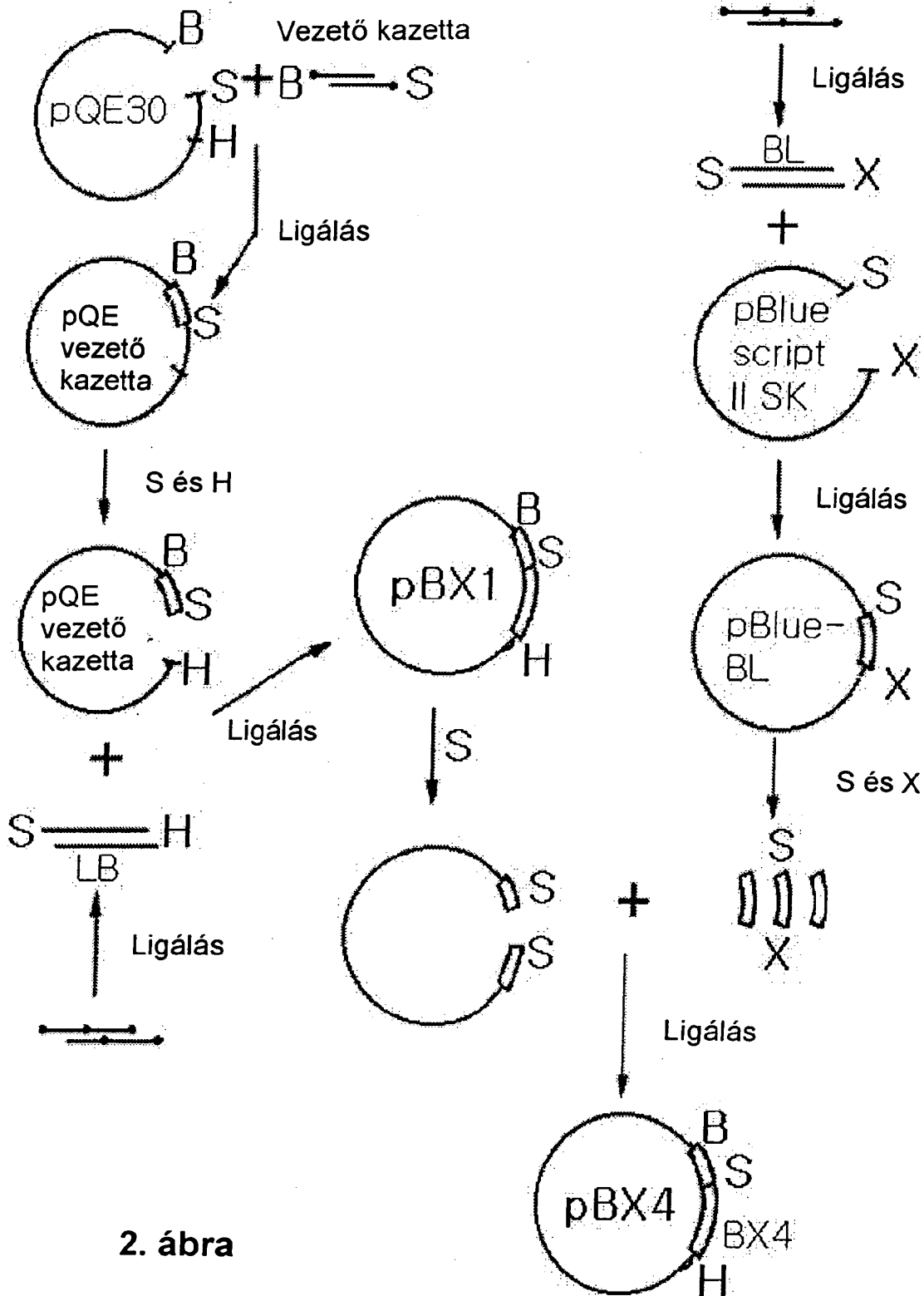
1b ábra



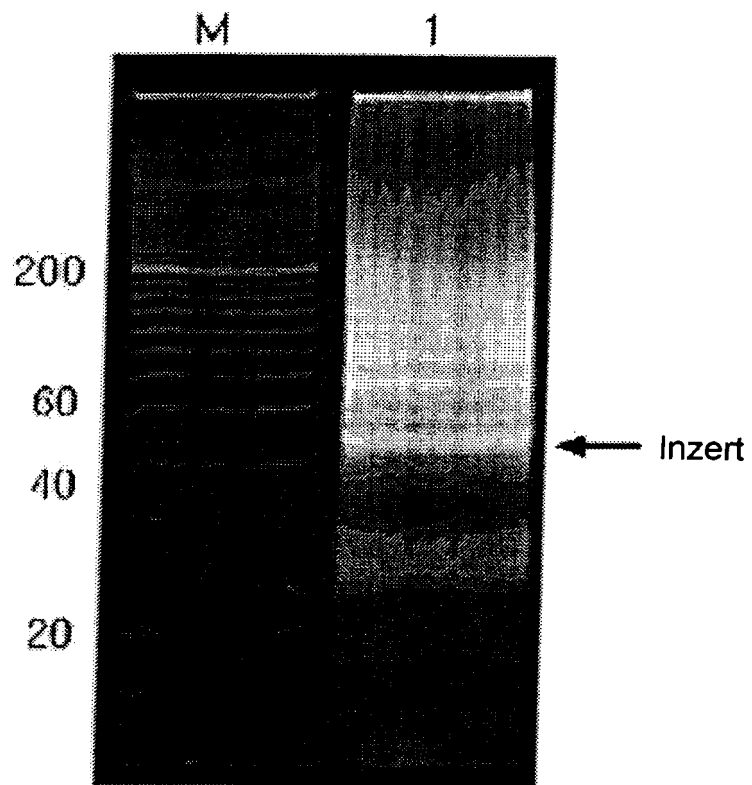
1c ábra



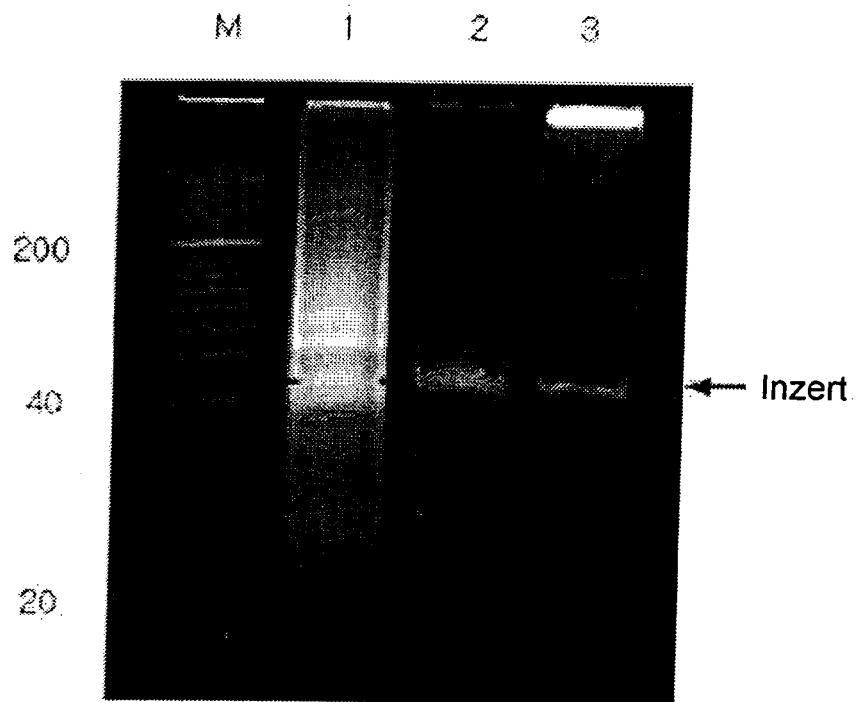
1d ábra



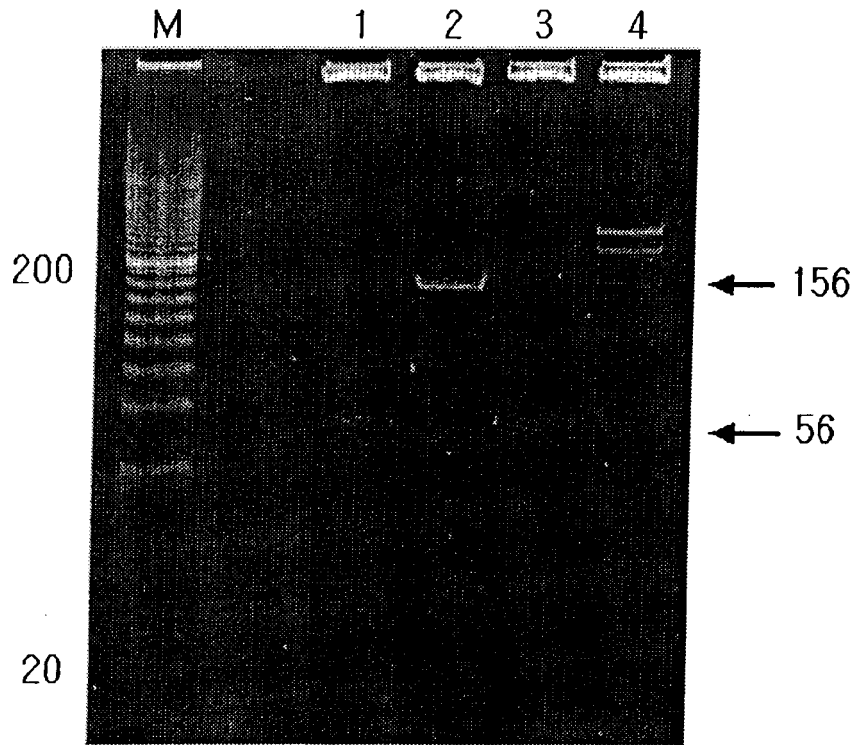
2. ábra



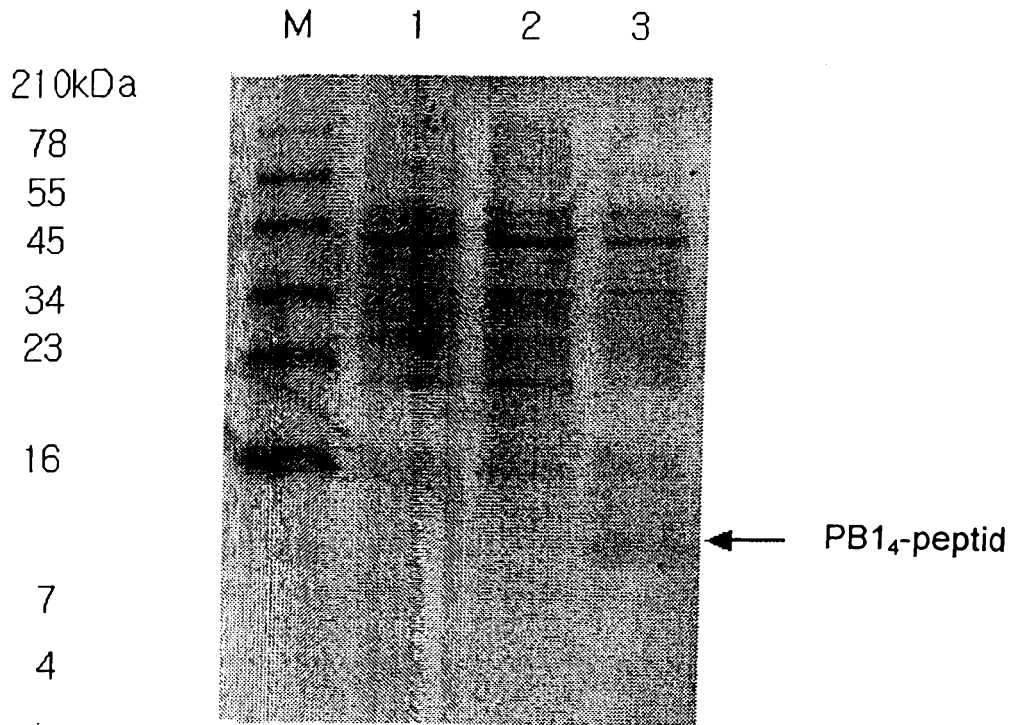
3. ábra



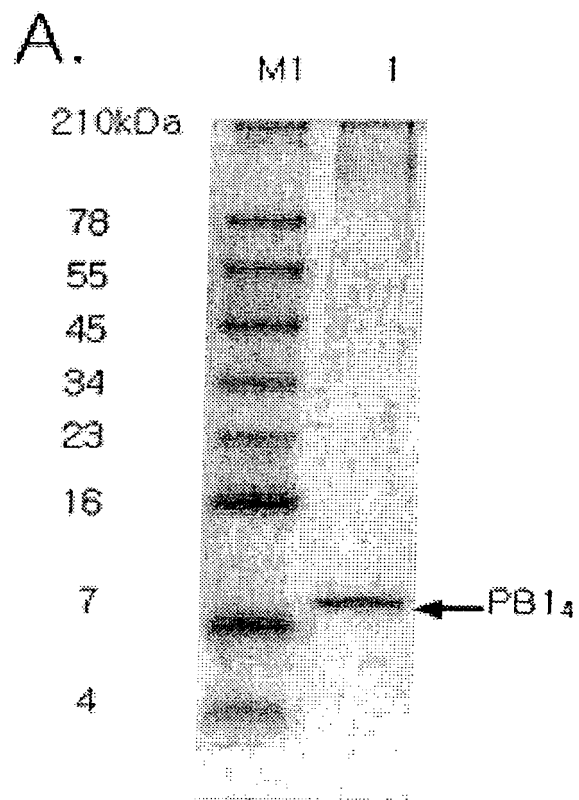
4. ábra



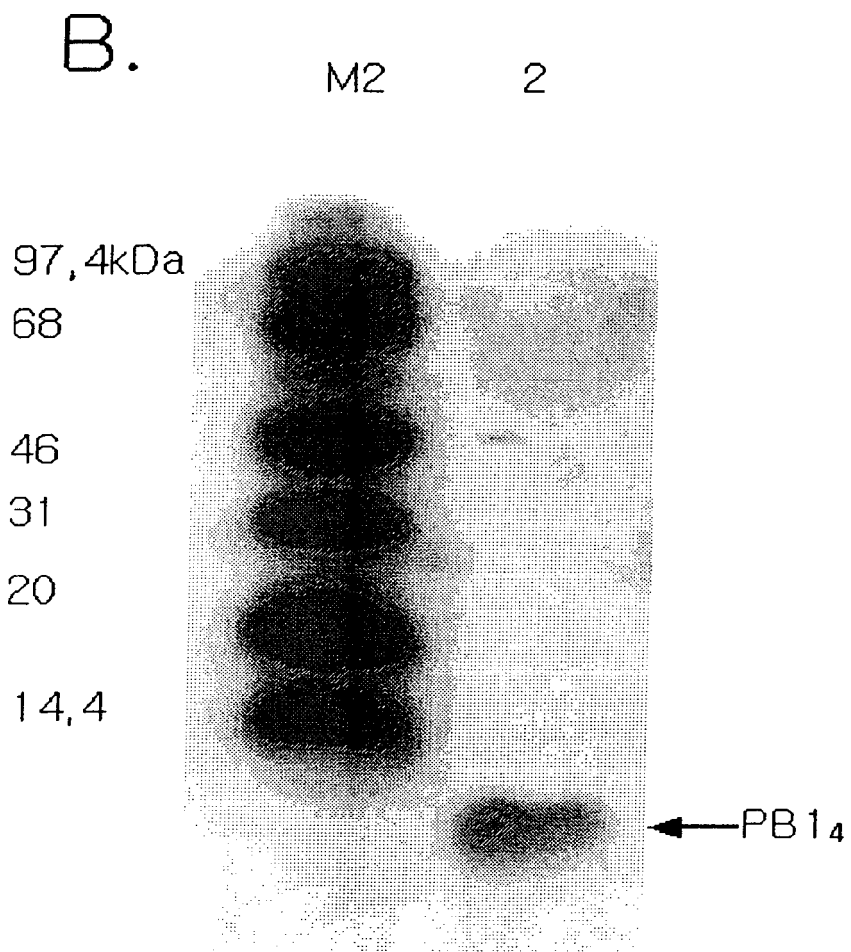
5. ábra



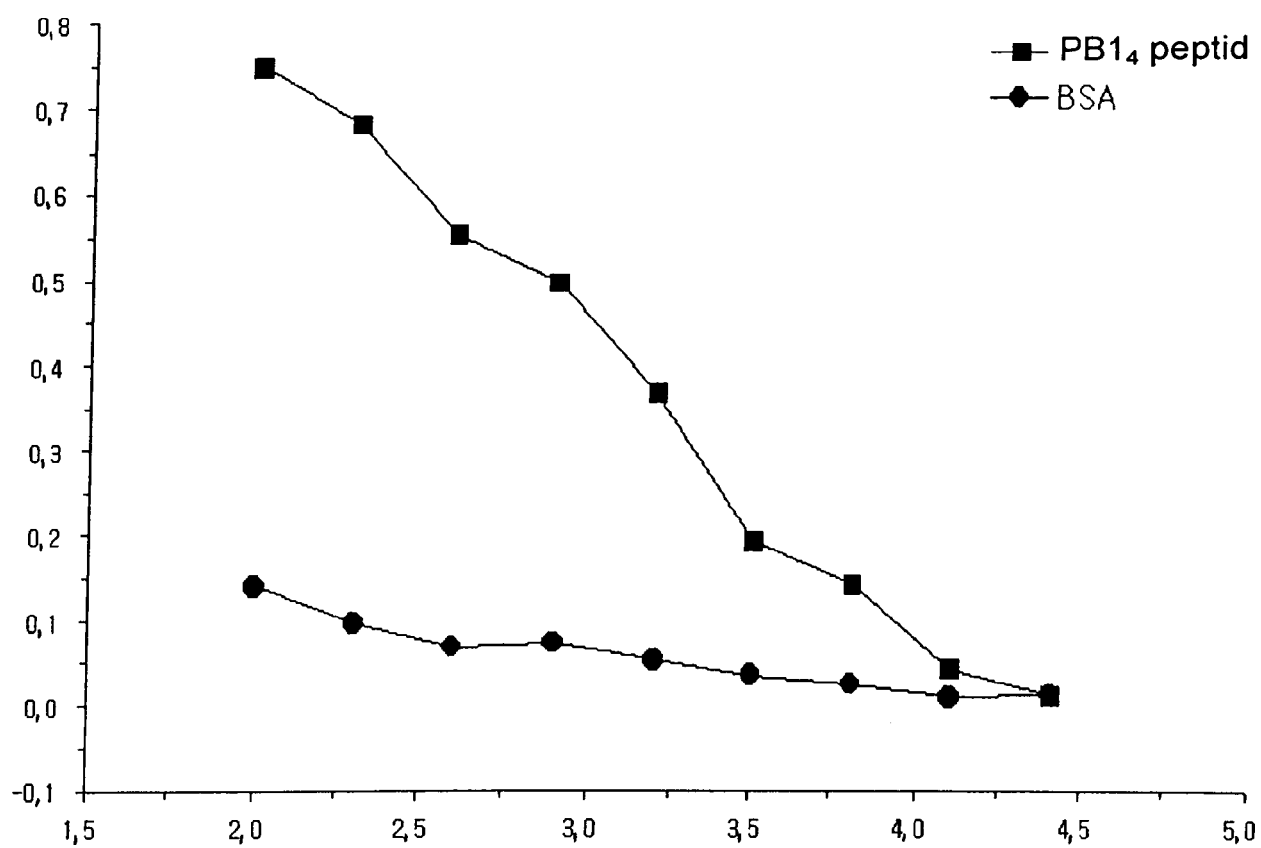
6. ábra



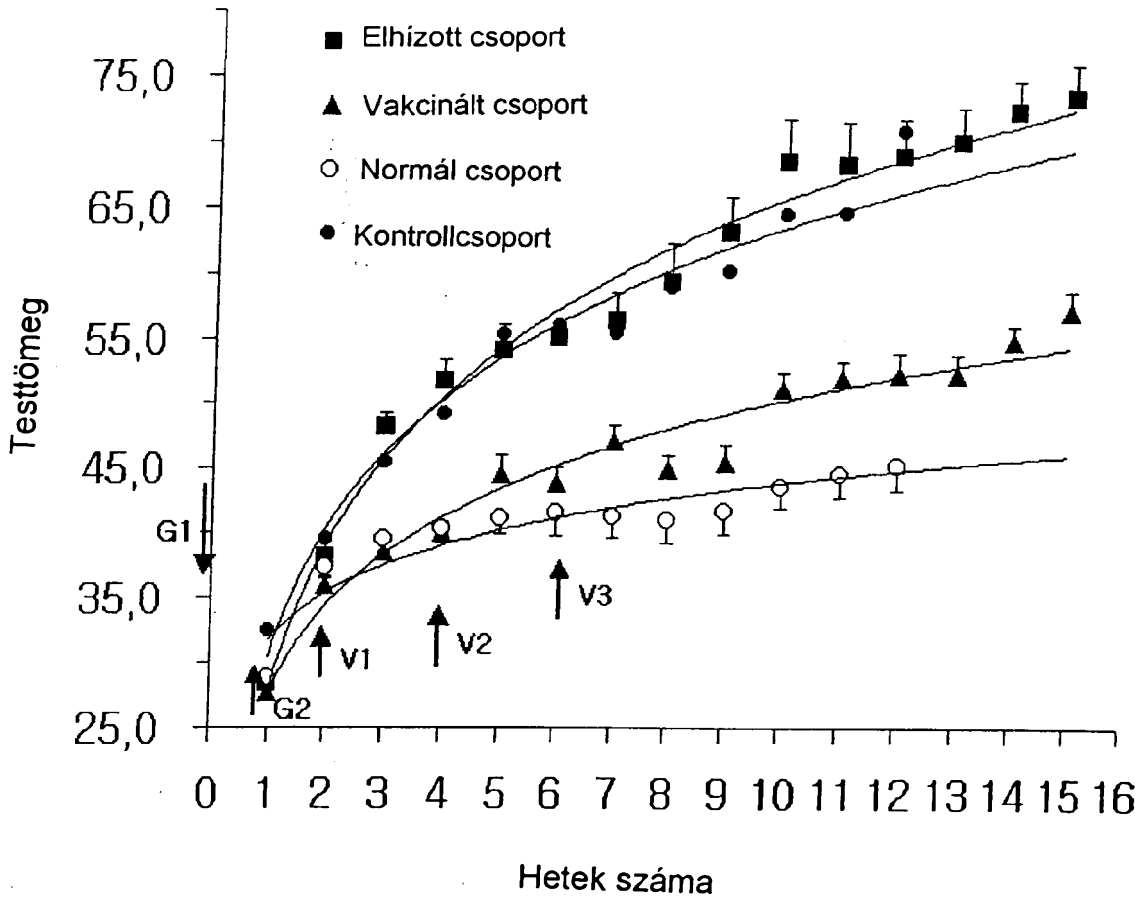
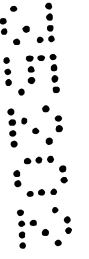
7. ábra



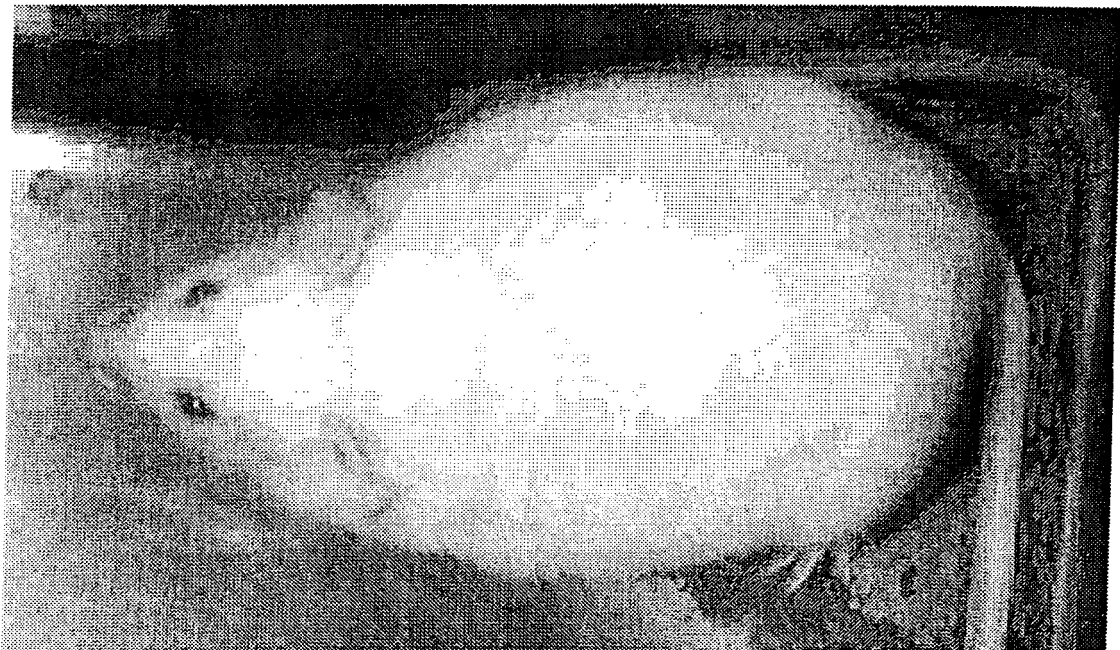
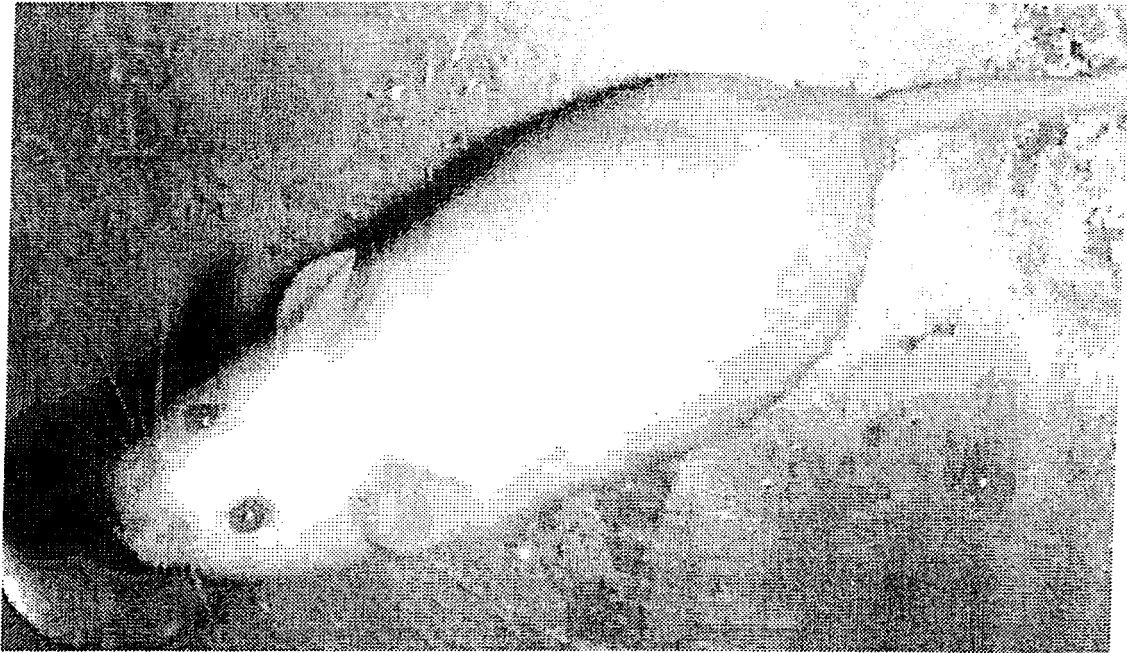
8. ábra



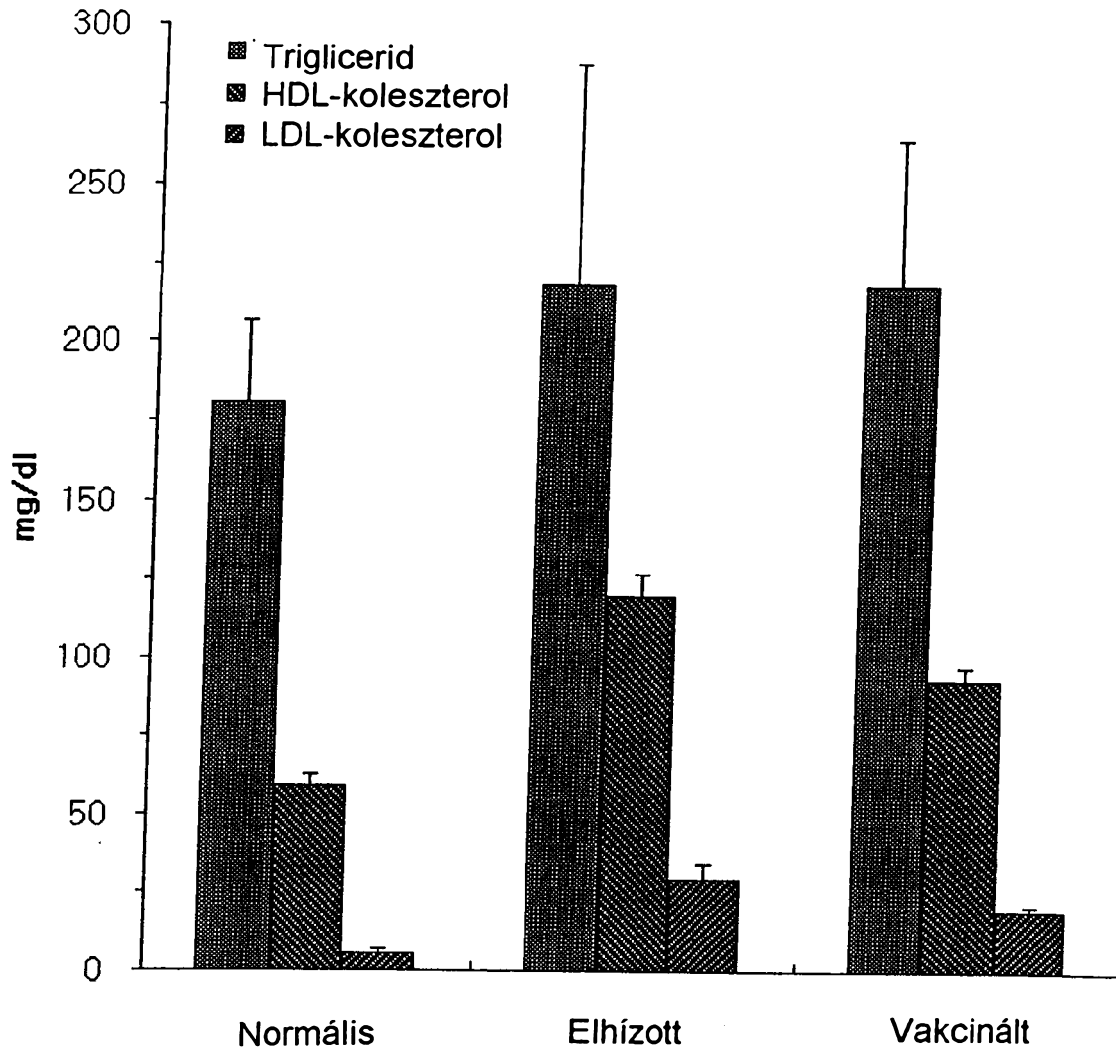
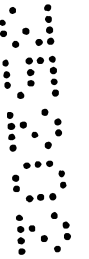
9. ábra



10. ábra



11(a), 11(b) ábra



12. ábra