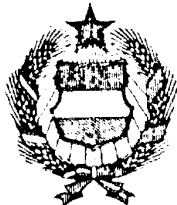


(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11)

196842

B

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO.

C 12 N 15/00

C 12 P 21/00

A bejelentés napja: (22) 1983. III. 14. (21) 860/83

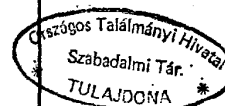
A bejelentés elsőbbsége: (33) US

(32) 1982. III. 15.

(31) 358 414

A közzététel napja: (41)(42) 1984. IV. 30.

Megjelent: (45) 1989. 09. 04.



Feltaláló(k): (72)

Moore Kevin W., San Bruno, Zaffaroni Alejandro, Atherton,
Kalifornia, US

Szabadalmas: (73)

Schering Corporation, Kenilworth, New Jersey, US

(54)

Eljárás hibrid DNS és az ezt tartalmazó kötő készítmény előállítására

(57)KIVONAT

A találmány tárgya előre meghatározott ligandra specifikus immunglobulin könnyű vagy nehéz lánc változó régiójának legalább egy részét alkotó aminosav-szekvenciából álló kötő polipeptid előállítására. Ugy járnak el, hogy az adott láncot meghatározó mRNS-ből könnyű vagy nehéz láncok legalább egyikét leíró kétszálú cDNS-t állítanak elő,

A kétszálú cDNS-ről lehasítják az adott változó régió kivüleső részt leíró nukleotid-szekvenciát és a változó régiót kódoló meghatározott kétszálú cDNS előállítására a DNS-szekvencia 5'-végebe iniciációs, 3'-végebe terminációs kodont építenek be,

a kétszálú cDNS kifejezésére kifejeződő vektorba építik be a kialakított kétszálú cDNS-t és az adott, kialakított cDNS-t tartalmazó kifejeződő vektorral egy erre alkalmas gazdasejtet transzformálnak,

a transzformált gazdasejtet növesztik, amikor az adott könnyű és nehéz láncok egyikének kötő polipeptidje kifejeződik, és

izolálják az adott kötő polipeptidet.

A találmány tárgya továbbá a fenti polipeptidek bioszintézisét meghatározó genetikai információkat tartalmazó dezoxi-ribonukleinsav szakaszok előállítása.

A találmány szerinti eljárással az immunglobulin-eknél kisebb, de azok specifikusával és affinitásával rendelkező kötő molekulákat állíthatunk elő.

Az emlős immunrendszer egyedülálló képessége azon nagyszámú immunglobulinoknak nevezett protein bioszintézise, amelyek kiemelkedően magas specifikusuk egy adott molekulaszervezetre. Ezen proteineknek olyan a konformációjuk, hogy egy adott struktúrához specifikusan képesek komplementálódni, így nagy affinitású kötődés jön létre. Így módon az emlős immunrendszer válaszolni képes idegen molekulák, különösen mikroorganizmusok felületi membránjain lévő proteinek, toxinok inváziójára, amikor a behatoló test detoxifikálódik vagy felbomlik anélkül, hogy a gazdaszervezetre hatással lenne.

A védekező rendszer elsődleges immunglobulinja a gamma-globulin (IgG). Ennek a 150 000 dalton molekulású glikoproteinnak négy lánc van, két úgynevezett nehéz lánc és két könnyű lánc. Mindegyik láncban találunk egy változó és egy állandó szakaszt. A változó szakaszoknak köszönhető az immunglobulin kötődő képessége, míg az állandó szakaszok több más, az antitest affinitással közvetlenül nem összefüggő funkcióval rendelkeznek.

Bizonyos helyzetekben előnyös lenne, ha rendelkeznék az immunglobulinoknál kisebb, de az immunglobulinok specifikusával és affinitásával bíró kötő molekulákkal. A kisebb molekulák rövidebb ideig tartózkodnak az emlős szervezetben. Ezenkívül, amikor az immunglobulin egy másik molekulához már hozzákötődött, gyakran előnyös, ha az így keletkező termék kisméretű. Gazdaságosabb is, ha kisebb molekulák képesek ellátni a nagyméretűek funkcióját.

Bizonyos helyzetekben előnyös nagyszámú molekulát szorosan együtt tartani. Kisebb molekulákat használva nagyobb számú molekulát juttathatunk egy adott kis térbe. Ezenkívül, ha a fenti kötő molekulákat hibrid DNS technikával állíthatjuk elő, megvan a lehetőségünk arra, hogy a molekula kötő részét több más polipeptidhez kapcsoljuk, így előállíthatunk olyan kötő molekulát, amelyek egy adott polipeptid lánc egyik vagy másik végéhez kovalens kémiai kötéssel kapcsolódnak.

Amikor az immunglobulinokat *in vivo* diagnózishoz vagy terápiáshoz használjuk, immunogén lehet az allogén gazdaszervezet antiszéruma vagy egy monoklonózott antitest. Ha más molekulacsoportokat használunk az antitesthez, a képződő termék immunogéné válik és megindul a gazdaszervezet antitest képzése az immunglobulin állandó szakaszával vagy a molekula más részével szemben.

A fentiek alapján fontos lenne olyan módszerek kifejlesztése, amelyek révén lehetővé válna egy adott antigénnel vagy liganiddal szemben erősen specifikus kötő molekulákat tartalmazó homogén készítmények előállítása, amelyek azonban a teljes immunglobulinok hátrányaival nem rendelkeznek és bírnak a kis molekulású molekulák előnyeivel.

Az immunglobulinok nehéz és könnyű láncával kapcsolatos problémákra vonatkozóan ajánljuk Sharon és Givol (Biochem., 15., 1591-1594, 1976) Rosenblatt és Hood (Genetic Engineering, 3, 157-188, 1981) munkáit. Az egér immunglobulinjának könnyű láncát baktérium klónban Amster és munkatársai (Nucleic Acids Res., 8, 2055-2065, 1980) állították elő. A leírás során megadott közleményekben módszereket és készítményeket írnak le.

A találmány tárgya eljárás új protein-komplexek előállítására. A találmány szerinti homogén készítm-

nyek tartalmazzák egy adott immunglobulin könnyű és nehéz láncainak változó szakaszait, ezek pedig külön-külön vagy együtt egy adott antigént előre meghatározott haptén szakaszon specifikusan kötő komplexet alkotnak. A találmány szerinti homogén készítmények két, egy adott immunglobulin változó szakaszának legalább egy részét meghatározó aminosav-szekvenciáját tartalmazó, de az állandó szakaszt gyakorlatilag nem tartalmazó polipeptid láncból álló specifikus kötő készítmények, ahol a nevezett immunglobulin egy adott, előre meghatározott liganddal szemben kötő aktivitással bír. A két polipeptid lánc az előre meghatározott ligandot erősen kötő komplex molekulává alakul.

A polipeptid láncokat genetikai úton, génszűrészel készített mikroorganizmusok tenyésztésével állítjuk elő. Hibrid DNS technikát használva a cDNS-ről lehasítjuk a könnyű és nehéz lánc változó szakaszairól a felesleges nukleotidokat. A kapott kétszálú cDNS-t megfelelő kifejeződő vektor molekulába építjük be, majd transzkripcióra és transzlációra sejtbe juttatjuk. A kapott könnyű és nehéz láncok a változó szakasz legalábbis nagy részét meghatározzák és olyan komplex molekulává alakulnak, amely erős affinitással specifikusan kötődnek egy antigén vagy liganid haptén helyéhez. A kötődési konstans általában nagyobb, mint 10^5 , gyakran nagyobb mint 10^6 , előnyösen nagyobb, mint 10^8 .

A liganid kötésére a könnyű és nehéz láncok változó szakaszait tartalmazó polipeptid láncokat általában együtt használjuk. Esetenként azonban használhatunk egyetlen láncot is, ha ennek megfelelő kötő affinitása van a kérdéses liganiddal szemben.

A találmány szerinti készítményekben lévő két polipeptid lánc, egyenként vagy együttesen, egy adott immunglobulin kötőhelyével analóg receptor helyet alkot. A készítményt rFv jellel jelöljük, az egy láncot tartalmazót pedig L-rFv (könnyű lánc) vagy H-rFv-nek (nehéz lánc). A két lánc is lehet, származhat a könnyű vagy nehéz lánc szekvenciájából. Az rFv polipeptid lánc általában 125-nél kevesebb aminosavat tartalmaz, előnyösen 95-nél; még előnyösebben 100-nál többet. A H-rFv lánc előnyösen 110 és 125 közötti számú, az L-rFv lánc pedig 95 és 115 közötti számú aminosavat tartalmaz.

Az adott idiotípustól függően a készítmény aminosav összetétele széles határok között változik. A 60-75 aminosav között általában két cisztein van, ezek diszulfid-kötést (cisztein) alkotnak. A két lánc általában az immunglobulinok könnyű és nehéz láncában található változó szakaszok idiotípusainak másolata, esetenként azonban elegendő, ha a könnyű vagy a nehéz lánc változó szakaszai kombinálódnak.

Gyakran előnyös, ha az rFv egyik vagy mindkét lánc például radioizotóppal, fluoreszkáló molekulával vagy toxinnal jelölt, vagy semleges, élettani szempontból elfogadható vívíonyagokhoz, például szintetikus szerves polimerhez, poliszacharidhoz, természetes proteinekhez vagy más, nem immunaktív anyaghoz van kötve.

Esetenként előnyös, ha a két protein lánc például a karboxil-terminális végén lévő ciszteinnel kovalensen kapcsol. A láncokat általában úgy állítják elő, hogy az állandó szakaszok hiányoznak, a J szakasz részben vagy teljesen jelen lehet, vagy hiányozhat. A D szakasz a H-rFv transzkripció másolatában általában je-

len van.

Az rFv-ben a teljes aminosav készlet relatíve kis százaléka változik idiotípustól függően. Így viszonylag állandó vázzal bíró területek és változó, úgynevezett hipervariálódó szakaszok alakulnak ki.

Az rFv C-terminális szakaszában a szekveniák nagyobb mértékben variálódhatnak, mint az N-terminális végen, és így, a jelen leírás értelmében tovább módosítható, amikor a természetben előforduló nehéz és könnyű láncoktól még inkább különböző változatok jöhetnek létre. A hipervariábilis szakasz aminosavainak megváltoztatására mutációt okozó szintetikus oligonukleotid építhető be.

Az rFv hibrid DNS technikával való előállítását először általánosságban, majd részletesen ismertetjük.

Jelentős kötő affinitással rendelkező homogén rFv előállítására az emlős immunrendszerből indulunk ki. Hibridoma vagy más monoklonozott antitestet termelő sejtől izoláljuk a mRNS-t (hírvívő RNS) és felhasználjuk az immunglobulin könnyű és/vagy nehéz láncainak szekvenciáját meghatározó cDNS előállítására. A jobbra és balra eső szekvenciák esetén a változó szakaszt meghatározó DNS valószínűleg vezető (leader) régiót tartalmazó első és befejező szakaszába legalább részben komplementer rövid DNS szekvenciákat (oligonukleotidokat) építünk be a primer repair vagy in vitro mutagenézis biztosítására, amikor különleges szakaszok kieshetnek a DNS-ből és beépülhet a transzlációs kontroll jele. In vivo mutagenéziskor olyan oligonukleotidot használunk, amely a cDNS egyik szálával heteroduplexet alkot, ha a DNS polimeráz I Klenow-fragmensével kezeljük. Primer repair esetén homoduplexet kialakító oligonukleotidra van szükség, ilyen esetben is a fenti enzimet használjuk. A folyamatot kétszer végezzük el, egyszer a kódoló szállal, egyszer pedig a nem kódolóval, amikor olyan kétszálú cDNS-t kapunk, amely meghatározza a változó szakaszt, és előre meghatározott helyen tartalmazza a transzlációs szabályozó jeleket. Ezt a kétszálú cDNS-t megfelelő vektor molekulába, például plazmidba építjük be, amikor olyan hibrid vektor DNS-t kapunk, amely replikálódni képes és megfelelő szabályozó szakaszokat tartalmaz replikációra, szelekcióra és kifejeződésre.

A hibrid vektor DNS-t ezután megfelelő gazdasejtbe juttatjuk az rFv könnyű és nehéz polipeptid láncában lévő változó szakaszok kifejezésére, majd izoláljuk a polipeptideket. Az rFv könnyű és nehéz polipeptid láncainak változó szakaszait ezt követően megfelelő reakcióelegyben összekapcsoljuk, amikor létrejön az rFv.

Mivel az idiotípusok változnak, a jelen szabadalmi leírásban megadott reakciólépések sorrendjének változtatásával lehetőségünk van a változó szakaszokat meghatározó kódoló-szekvenciák széles körű változtatására. Ugyancsak hasíthatjuk a kétszálú cDNS-t és a vektor DNS-t a használt szabályozó jelek, különösen a promotor optimalizálására. Megfelelően helyezhetjük el a riboszóma kötőhelyet és a változó szakaszt iniciáló kodont abból a célból, hogy optimalizáljuk a polipeptid változó szakaszát meghatározó DNS kifejeződését.

A változó szakaszt meghatározó szekvenciát tartalmazó hibrid vektorral megfelelő gazdasejtet transzformálunk, amikor az információ kifejeződik. A transzformánsokat a vektorban jelenlévő markerek segítsé-

gével szelektáljuk, majd klónozzuk és szaporítjuk. A transzformánsok által termelt polipeptidet a sejtek elkülönítésével és a felülúszó izolálásával kapjuk, az adott típusú polipeptidek ugyanis oldatba szekretálódnak. Abban az esetben, ha a polipeptidek nem kerülnek oldatba, a transzformáns sejteket izoláljuk, lizáljuk és elkülönítjük a polipeptidet. Ismert módszereket, például gélelektroforézist, frakcionált kicsapást, affinitás kromatográfiát, vagy nagynyomású folyadékkromatográfiát vagy hasonlókat használva növekvő mennyiségű, változó szakaszt hordozó polipeptideket tartalmazó frakciókhoz juthatunk. Az eredeti lizátumot vagy felülúszót, vagy az ebből nyert tömény frakciókat immunméréssel vizsgáljuk és megállapítjuk a változó szakaszt tartalmazó polipeptidek jelenlétét.

A szekretált nehéz vagy könnyű láncot az alábbiak szerinti izoláljuk. Monoklonozott immunglobulinra poliklonozott antiszérumot állítunk elő oly módon, hogy megfelelő gerincest a teljes monoklonozott antitesttel immunizálunk, így olyan antiszérum jön létre, amely felismeri a nehéz és könnyű láncok determinánsait. A teljes immunglobulint vagy csak a könnyű vagy nehéz láncot felismerő antitesteket az antiszérumban jelen lévő más antitestektől elkülöníthetjük és tisztíthatjuk. Olyan affinitív kromatográfiás oszlopot készítünk, amely megfelelő hordozóra kovalensen kötve tartalmazza a teljes immunglobulint vagy csak a nehéz vagy könnyű láncot, majd az oszlophoz kötjük és eluáljuk a teljes immunglobulinra, vagy a nehéz vagy a könnyű láncra antitestként viselkedő és az oszlophoz kötődő molekulákat. Az iszlopot denaturáljuk és a tisztított antitesteket eltávolítjuk, majd megfelelő hordozóra kötve kromatografáló oszlopot készítünk az rFv nehéz és könnyű láncainak tisztítására.

Abban az esetben, ha a könnyű és nehéz láncok nem szekretálódnak, úgy járunk el, hogy a könnyű és nehéz láncok bioszintézisét meghatározó kétszálú cDNS-t tartalmazó transzformált mikroorganizmusokat folyékony halmazállapotú táptalajon tenyésztjük, tiszta lizátumot állítunk elő például a sejtek lizozimos kezelésével, roncsoljuk a sejtmembránt és az így kapott elegyet centrifugáljuk és összegyűjtjük a felülúszót. A lizátumot immunszorbciós affinitás kromatográfiával (lásd fent) tisztítjuk, specifikus poliklonozott antiszérumot használva. Az oszlophoz kötődött változó szakaszokat tartalmazó proteint megfelelő denaturáló oldószerrel eluáljuk. A nehéz és könnyű láncot tartalmazó eluátumot összegyűjtjük és megfelelően kezelve renaturáljuk a fehérjéket, amikor sorrendben megkapjuk a H-rFv és L-rFv terméket. Renaturáláshoz az eluátumot megfelelő vízes pufferral szemben dializáljuk. A keveréket ezután tovább tisztítjuk megfelelő ligand-affinitív oszlopon átvezetve, a kötődő molekulákat megfelelő denaturáló oldószerrel eluáljuk. A fentiek szerint eljárva renaturáljuk a változó régiókat, amikor olyan oldatot kapunk, amely tartalmazza a különböző célokra használható rFv terméket.

A találmány szerinti eljárással olyan molekulákat állíthatunk elő, amelyek immunglobulinok nehéz és könnyű láncainak változó szakaszait tartalmazzák polipeptid duplexként és amelyek rendelkeznek az immunglobulinok specifitásával. Mivel a találmány szerinti rFv molekulák nem tartalmazzak állandó sza-

kaszt, kevésbé immunogének és így előállíthatók a kezelendő szervezetre nézve xenogén forrásokból. Ezenkívül a találmány szerinti rFv molekulák nem heterogén, hanem homogén keverékben léteznek. (A különböző hosszúságú láncokat tartalmazó heterogén keverékeket más módszerekkel, például enzimes vagy savas hidrolízissel állítjuk elő.) A találmány szerinti homogén készítményeket homogenitásuk miatt egyszerűen módosíthatjuk és pontosan meghatározhatjuk terápiás mennyiségüket. A készítmény nem tartalmaz továbbá a teljes immunglobulinokból származó láncokat, amelyek tökéletlen emésztés esetén nem vesztik el immunogén részeiket és pontosan meghatározhatjuk terápia mennyiségüket. A készítmény nem tartalmaz továbbá a teljes immunglobulinokból származó láncokat, amelyek tökéletlen emésztés esetén nem vesztik el immunogén részeiket és pontosan meghatározhatjuk terápia mennyiségüket. Végül a találmány szerinti eljárással a kívánt rFv-ből jó kitermeléssel és nagy tisztaságban állíthatunk elő nagyobb mennyiségű terméket.

A találmány szerinti eljárással továbbá olyan megfelelő transzformáló kifejeződő vektorokat és plazmidokat állíthatunk elő, amelyek hordozzák az adott rFv molekulákat meghatározó kétszálú DNS-szekvenciákat, előállíthatunk a kifejeződő DNS vektorokat tartalmazó transzformált gazdasejteket, például bakteriumokat, mint például *E. coli*-t vagy élesztőket, a találmány szerinti eljárás során transzformált kifejeződő vektor DNS molekulákat állítunk elő és a transzformált sejtek tenyésztésével előállítjuk a megfelelő rFv molekulákat.

A találmány szerinti eljárással előállított transzformáló kifejeződő vektor vagy plazmid DNS molekulák olyan kétszálú DNS-szekvenciát tartalmaznak, amely meghatározza egy előre meghatározott ligandra specifikus immunglobulin könnyű vagy nehéz láncának változó szakaszát és nem tartalmaznak olyan nukleotidokat, amelyek a fenti változó régió kivüleső aminosavakat kódolnak, a DNS-szekvencia hordozza továbbá az 5'-, illetve a 3'- végén az iniciációs, illetve a terminációs kodonokat.

A liganid lehet például enzim vagy egy felületi fehérje. A kétszálú DNS-szekvencia kódolhatja például a 95-125, előnyösen 95-115 aminosavból álló nehéz lánc változó szakaszát, elsősorban legalább a nehéz lánc D régióját.

A találmány tárgya eljárás előre meghatározott liganidra specifikus immunglobulin könnyű vagy nehéz láncának változó szakaszát meghatározó kétszálú DNS-szekvenciát tartalmazó transzformáló kifejeződő vektor vagy plazmid DNS előállítására, amely DNS nem tartalmazza a fenti változó szakaszon kivüleső aminosavakat kódoló nukleotidokat, de hordozza a 3'- végén a terminációs és az 5'- végén az iniciációs kodonokat.

A fenti vektor vagy plazmid DNS molekulák előállítására a találmány értelmében úgy járunk el, hogy kétszálú, a könnyű vagy nehéz láncok legalább egyikét meghatározó cDNS-t állítunk elő a fenti láncokat kódoló mRNS-ből,

az adott változó szakaszon kivüleső nukleotid-szekvenciákat eltávolítjuk a kétszálú cDNS-ről és beépítjük az iniciációs, illetve a terminációs kodonokat a DNS-szakasz 5'- illetve 3'-végre, amikor olyan hasított cDNS-t kapunk, amely az adott változó régiót határozza meg, majd

az adott, hasított kétszálú cDNS molekulát beépítjük egy kifejeződő vektor DNS-be, amikor az adott kétszálú cDNS kifejeződik.

Az iniciációs és terminációs kodonokat *in vitro*

mutagenézissel építjük be. Adott esetben beiktathatunk egy további lépést is a fenti mutagenézis előtt, amelynek során a kétszálú cDNS legalább egy nukleotidját olyan kodonra változtatjuk, amely egy másik aminosav beépülését határozza meg.

A találmány értelmében részletesen úgy járunk el, hogy

5 a) egy immunglobulin állandó és változó szakaszból álló, ahol a változó régió 95-125 aminosavból áll, könnyű vagy nehéz láncát meghatározó cDNS-t izoláljuk, a cDNS előállítására reverz transzkriptázzal kezeljük az mRNS-t, kétszálú cDNS előállítására DNS polimerázzal létrehozunk az egyszálú cDNS komplementer szálját, ahol a kétszálú cDNS kódoló szálja meghatározza az adott könnyű vagy nehéz láncot és ahol a kódoló szálak az adott immunglobulin vezető szekvenciáját a változó és állandó régiót meghatározó szekvenciát tartalmazzák 5'-3'-irányban, majd az előállított kétszálú cDNS-t klónozzuk,

10 b) az adott klónozott kétszálú cDNS-ből kódoló és nem kódoló egyszálú cDNS szálát állítunk elő, és ezután a c., d., e., f. lépéseket *decf* vagy *cedf* sorrendben elvégezzük,

15 c) a nem kódoló szál vezető szakaszt és változó szakaszt meghatározó helyei kapcsolódásának pontján olyan oligonukleotid primert építünk be, amely az iniciációs hely létrehozásához alkalmas iniciációs kodont tartalmaz, amikor megkapjuk az első duplex molekulát, ezt a duplexet enzimesen kezeljük abból a célból, hogy az első oligonukleotid primert 5'-3'-irányban a nem kódoló, egyszálú cDNS szál mentén meghosszabbítsuk, majd ezután az oligonukleotid primerrel komplementer szálal ellenkező irányban leemésztjük a nem kódoló egyszálú cDNS szakaszt, amikor N-terminálissal meghatározott kétszálú cDNS-t kapunk,

30 d) a változó és az állandó szakaszt meghatározó DNS-szekvenciák találkozási pontjába egy második olyan oligonukleotid primert hibridizálunk, amely stop anti-kodont tartalmaz, amikor létrejön a második duplex molekula, ezt a duplexet enzimatikusan kezeljük a kódoló szálra komplementer 5'-3'-irányú második oligonukleotid primer meghosszabbítása és a másik irányban elhelyezkedő kódoló egyszálú cDNS-t leemésztve C-terminálisan végződő kétszálú cDNS-t hozunk létre,

35 e) az előállított C- vagy N-terminálisan meghatározott kétszálú cDNS-t klónozzuk, a kapott C- vagy N-terminálisan meghatározott cDNS-t kódoló és nem kódoló szálakra választjuk szét, végül a kódoló szálát használjuk, ha a d. lépés következik, de a nem kódolót, ha a c. lépést végezzük el, ezután, végül

40 f) a kapott N- és C-terminálisan végződő cDNS-t klónozzuk, és a fenti, az adott kódoló szekvenciát tartalmazó kétszálú cDNS-t a transzkripció és transláció szabályozó jelekkel megfelelő összefüggésben beépítjük egy kifejeződő vektorba vagy plazmidba.

A találmány egy előnyös kivitelezési változata szerint úgy járunk el, hogy

45 A) előállítunk egy immunglobulin könnyű vagy nehéz láncát meghatározó kétszálú cDNS-t, ahol a szálak mindegyike egy állandó és egy változó szakaszból áll, és ahol a változó szakasz 95-125 aminosavat tartalmaz, a cDNS előállítására az adott láncot meghatározó mRNS-t izoláljuk, majd reverz transzkriptázzal előállítjuk a megfelelő egyszálú cDNS-t,

60

az adott egyszálú cDNS-re komplementer szálát szintetizálunk DNS-polimerázzal, amikor olyan kétszálú cDNS-t kapunk, amelynek kódoló szálja az adott könnyű vagy nehéz láncot határozza meg, és ahol a kódoló szál az adott immunglobulinra jellemző vezető szekvenciát, változó és konstans szakaszt meghatározó DNS-szekvenciákat tartalmaz $5'-3'$ -irányban, a kapott kétszálú cDNS-t klónozzuk,

B). az adott könnyű vagy nehéz lánc adott változó szakaszával szomszédos régiókat meghatározó DNS legalább egy részét eltávolítjuk úgy, hogy a klónozott kétszálú cDNS-t kódoló és nem kódoló szálakra választjuk,

a nem kódoló szálhoz olyan oligonukleotid primert hibridizálunk, amely a változó szakasz kifejeződését lehetővé tevő iniciációs helyet meghatározó iniciációs kodont tartalmaz, az oligonukleotid primer komplementer a vezető szakasz N-terminális végét meghatározó szekvenciával vagy részlegesen komplementer a vezető szakasz és a változó régió találkozási helyét meghatározó DNS-szekvenciával és egy nem komplementer iniciációs kodonnal rendelkezik az adott létrehozott első duplex molekulát enzimatikusan kezeljük a duplex $5'-3'$ -irányban való meghosszabbítására, amikor a nem kódoló egyszálú cDNS-t egészen az első oligonukleotid primerrel komplementer szekvenciáig, amiután N-terminálisan meghatározott kétszálú cDNS-t kapunk,

az N-terminálisan meghatározott kétszálú cDNS-t klónozzuk,

a kapott N-terminálisan meghatározott kétszálú cDNS-t kódoló és nem kódoló szálakra választjuk szét,

a kódoló szálhoz stop anti-kodont tartalmazó, de egyébként az adott változó szakasz és állandó szakasz határát meghatározó résszel komplementer szekvenciát tartalmazó második oligonukleotid primert hibridizálunk, amikor megkapjuk a második duplex molekulát, ahol a stop anti-kodon a változó szakasz végén helyezkedik el, ezután a kapott duplexet enzimatikusan kezeljük a második oligonukleotid primer $5'-3'$ -irányban való meghosszabbítására a kódoló szálra komplementer módon, majd a második irányban, a második oligonukleotid primerre komplementer szekvenciáig leemészjtjük a kódoló egyszálú cDNS-t, amiután olyan N- és C-terminálisan meghatározott kétszálú cDNS-t kapunk, amely egy adott immunglobulin könnyű vagy nehéz láncában lévő változó régiót határoz meg, az állandó szakasz kódja pedig hiányzik, az N- és C-terminálisan kialakított kétszálú cDNS-t klónozzuk,

az N- és C-terminálisan meghatározott kétszálú cDNS-t beépítjük egy kifejeződő vektorba vagy plazmidba, a beépítés úgy történik, hogy a kódoló szekvencia megfelelő kapcsolatban legyen a transzkripció és transláció szabályozó jelekkel.

Az első oligonukleotid primer homoduplex lehet az említett vezető szekvencia N-terminális nem kódoló szálára nézve, vagy hibridizálva lehet az említett vezető szekvencia és a változó szekvencia találkozási helyére abból a célból, hogy a változó szakaszt meghatározó DNS-szekvencia N-terminális részébe egy iniciációs kodont építsünk be. A cDNS láncre nézve legalább egy oligonukleotid primer csak részlegesen komplementer.

A találmány szerinti eljárásba egy további lépést is

beiktathatunk a fenti beépítés előtt, nevezetesen az N- és C-terminálisan hasított kétszálú cDNS-be restrikciós linkereket (felismerőhelyek) építhetünk be, majd a linkereket enzimatikusan hasítva kohézió (ragadás) végeket hozunk létre. Mindegyik hibridizációs lépést követő klónozás után olyan klónokat szelektálhatunk, amelyek rendelkeznek az említett első vagy második oligonukleotid-szekvenciával, majd izoláljuk a kétszálú cDNS-t tartalmazó DNS-t és újra klónozzuk.

A találmány szerinti eljárással olyan kétszálú cDNS-t hordozó transzformáló kifejeződő vektor vagy plazmid állítható elő, amelyben a cDNS-szekvencia egy protein vagy enzim csak egy adott polipeptid láncrészletét határozza meg, és amely DNS-szekvencia az $5'$ - illetve a $3'$ -végen iniciációs, illetve terminációs kodonnal rendelkezik.

Úgy járunk el, hogy

az adott proteint vagy enzimet meghatározó mRNS-ből cDNS-t állítunk elő,

a kétszálú cDNS-ről az adott polipeptid láncon kívül eső nukleotid szekvenciákat eltávolítjuk és az $5'$ - illetve a $3'$ -végen iniciációs, illetve terminációs kodont építünk be, amikor olyan meghatározott,

kétszálú cDNS-hez jutunk, amely az adott polipeptid lánc egy adott részét határozza meg, majd ezt követően az előállított hasított, kétszálú cDNS-t kifejezésre egy kifejeződő vektorba építjük be

A találmány szerinti eljárás és különösen az a.f. pontokban megadottak tetszés szerint adaptálhatók.

A találmány szerinti eljárás egy előnyös kivitelezési változata szerint előre meghatározott ligandra specifikus immunglobulin könnyű vagy nehéz láncában található változó szakasz legalább egy részét adó aminosav-szekvenciát tartalmazó kötő polipeptidet állítunk elő, ahol az aminosav-szekvencia az analóg lánc kötő specifikusával rendelkezik.

Úgy járunk el, hogy

az adott láncot meghatározó mRNS-ből előállítunk legalább egy könnyű vagy nehéz láncot meghatározó cDNS-t,

a változó szakaszon kívüleső nukleotid-szekvenciákat eltávolítjuk a kétszálú cDNS-ről, majd az $5'$ - illetve a $3'$ -végeken iniciációs, illetve terminációs cDNS-t kapunk, amely az adott változó szakaszt meghatározza,

az előállított, hasított, kétszálú cDNS-t kifejezésre egy kifejeződő vektorba építjük és gazdasejtet transzformálunk a meghatározott, kétszálú cDNS-t hordozó kifejeződő vektorral,

a transzformált sejtet tenyésztjük, amikor az adott könnyű vagy nehéz lánc kötő polipeptidje kifejeződik, végül

izoláljuk az adott kötő polipeptidet.

A találmány szerinti eljárás egy másik előnyös kivitelezési változata szerint előre meghatározott ligandra specifikus immunglobulin könnyű vagy nehéz láncában található változó szakasz legalább egy részét adó aminosav-szekvenciát tartalmazó kötő polipeptidet állítunk elő, ahol az aminosav-szekvencia az analóg lánc kötő specifikusával rendelkezik.

Úgy járunk el, hogy az adott immunglobulin könnyű vagy nehéz láncában lévő változó szakaszt meghatározó, de az adott változó szakaszon kívüleső aminosav-szekvenciát meghatározó nukleotidokat nem tartalmazó, az $5'$ - illetve $3'$ -végeken iniciációs, illetve terminációs kodonnal ellátott kétszálú DNS-szekven-

ciát hordozó, transzformáló kifejeződő vektorral vagy plazmiddal transzformált gazdasejtet tenyészítjük.

Az előbbiakban részletesen ismertettük az rFv előállítását hibrid DNS technikával.

1. A megfelelő DNS-szekvencia izolálása

A DNS előállítására a változó régiót meghatározó génekre van szükségünk. A változó régiók származhatnak az IgA-, IgD-, IgE- vagy az IgM-ből, általában az IgM- és az IgG-ből. Ezt úgy akpjuk, hogy megfelelő gerinces állatot, általában háziállatot, leggyakrabban egeret immunizálunk. Az immunizálást a szokásos módon, az immunogén egyszerű vagy ismételt injekálásával végezzük, általában emlőssel, és általában két-három héten át. Az utolsó injekciót követő harmadik napon eltávolítjuk a lépet, sejtekre bontjuk és a sejteket hibridoma előállítására fuzionáljuk.

Az immunogénként egy adott antigént használunk, vagy ha haptent van jelen, úgy a haptent és az antigén antigenikus komplexét alkalmazzuk.

A hibridoma előállítására a lépsejteket fuzionálószer, például polietilén-glikol 6000 (PEG6000) jelenlétében több inter- vagy intraspecifikus mieloma sejttel fuzionáljuk, előnyösen egersejtekkel, például SP-2/0, NS-1 stb. sejtekkel, majd HAT szelektív tápoldatban szuszpendáljuk. A túlélő sejteket Mikrotiter csövekben növesztjük és az adott ligandra nézve antitestként viselkedő termék termelését megállapítjuk.

Az antitestek meghatározása jól ismert módszerekkel történik, jelzett antigéneket vagy hapténeket használhatunk, a jelzettséget radioizotóppal, fluoreszcenciával, enzimekkel stb. érjük el. Használhatunk más módszereket is, például két antitestet felhasználó szendvics-módszert, ahol az egyik antitestet a hordozóhoz kötjük, és a másikat jelezzük. A Mikrotiter csöveken lévő pozitív sejteket hígítással vagy lágy agaron klónozzuk. Az így kapott sejtvonalakat szaporítjuk, a szaporítás megfelelő tápoldatban történik. A sejteket szükség esetén folyékony nitrogénben fagyaszta tároljuk.

Az adott monoklonozott antitestet termelő sejtvonal szelektálása után tenyészítjük a sejteket. A tenyésztést addig folytatjuk, míg 1 liter tenyészetben milliliterenként 1×10^6 sejtet kapunk. A sejteket centrifugálással összegyűjtjük, majd lizáljuk.

Az adott DNS-szekvencia izolálására a változó szakaszt kifejező gént vagy a változó szakaszt kifejező mRNS-t keressük. A genomban lévő DNS vizsgálata során szembe kell nézni a nehézségekkel, hogy a változó szakaszt meghatározó szekvenciákat intronok választják szét. Izolálnunk kell a megfelelő exonokat tartalmazó DNS fragmens(eket), ki kell vágnunk az intronokat és ezután össze kell kapcsolnunk az exonokat, mégpedig megfelelő sorrendben és orientációban. Általában ezt nehéz kivitelezni, így az mRNS-t felhasználó módszert választjuk.

Ha az mRNS-t használjuk, a sejtek lizisét a ribonukleáz enzim gátlása közben végezzük. Az érett mRNS használatakor azonban szembe kell néznünk azzal, hogy nem teljes reverz transzkripció történhet, de ez minimalizálható. Első lépésként izoláljuk az mRNS-t. A poliadenilezett mRNS könnyen leválasztható a többi RNS molekulától oligo-(dT)-cellulóz oszlopont. Így olyan mRNS keveréket kapunk, amely mentes más RNS molekulától. Az immunglobulin polipeptid nehéz és könnyű láncát meghatározó szek-

venciákat használjuk, ezeket megfelelő forrásokból megkaphatjuk (lásd például Early és Hood, Genetic Engineering, Setlow és Hollanders szerk., 3. kötet, Plenum Publishing Corp., New York, 1981, 157-188. oldal).

A hibátlan immunglobulint leíró mRNS meghatározható in vitro transzlációval, nyúl retikulocita sejtmentes kivonatot használva (Pleham és Jackson, Eurp. J. Biochem., 77, 247-256, 1976). A kapott transzlációs termék izolálható az adott lánc egy vagy több szakaszára specifikus antitestekkel, például nyúl anti(egér IgC)-vel, ahol a láncok egér immunglobulinból származnak.

Az immuncsapadékot poliakril-amid gélelektroforézissel tovább analizálhatjuk, a komplexek jelenlétét antigén-antitest komplexekre érzékeny radioaktívan jelzett receptorokkal bizonyítjuk, például *S. aureus* A proteinnel, Rf-faktorról stb. A hibátlan mRNS jelenlétét bizonyítjuk továbbá RNS hibridációval (agaróz gélen való szétválasztással, az mRNS nitrocellulóz szűrőre vitelével, 80 °C hőmérsékleten forralva és radioaktív próbával vizsgálva).

A kívánt mRNS szekvenciákat tartalmazó nyers mRNS keveréket az alábbiak szerint kezeljük. Okayama és Berg módszerét (Mol. Cell. Biol., 1982) használva növeljük annak valószínűségét, hogy teljes hosszúságú cDNS-t kapjunk. Eljárhatunk azonban Efstadiadis és Villa-Komaroff módszere (Genetic Engineering Principles and Methods, 1, Setlow és Hollander szerk., New York, Plenum Press, 15-36. oldal, 1979) vagy Steinmetz és munkatársai szerint is (Cell, 24, 125-134, 1981.) A cDNS első szálát vírus reverz transzkriptázzal állítjuk elő oligo-(dT)-primer jelenlétében. A második szálát ezután reverz transzkriptázzal és a DNS polimeráz I Klenow-fragmensével vagy TH polimerázzal állítjuk elő. Ha szükséges, a kapott kétszálú cDNS-t egyszálú DNS-re specifikus nukleázzal, például S1 nukleázzal kezeljük a kétszálú cDNS-en lévő egyszálú szakaszok eltávolítására, majd a kapott cDNS-t klónozzuk.

2. Az L-rFv-t és a H-rFv-t meghatározó gének előállítása és kifejeződő vektorba juttatása sokszorozásra

Az immunglobulin könnyű és nehéz láncainak előállítására a kétszálú cDNS-t sokszorozítás vagy kifejezés céljából több vektor molekulába beépíthetjük. A megfelelő restrikciós helyet bíró vektor molekulát megfelelő restrikciós endonukleázzal kezeljük. Az mRNS reverz transzkripciójával kapott cDNS-t linkek hozzákapcsolásával, terminális transzferázzal kezelve vagy komplementer vagy tompa végek előállításával módosíthatjuk. A vektor molekula a transzformánsok szelektálására egy, kettő vagy több markert tartalmazhat. Előnyös az a vektor, amely több marker közül egyen belül egyetlen restrikciós szakaszt tartalmaz, így a transzformánsok szelektálhatók az egyik marker kifejeződése és a másodikmarker kifejeződésének hiánya alapján. Markerként használhatunk biocid rezisztencia markert, auxotróf komplementációt, vírus immunitást vagy hasonlókat.

Az mRNS-ből előállított kétszálú cDNS-sel megfelelő gazdasejtet, általában baktériumot, például *E. coli*, *B. subtilis*, *S. Cerevisiae*-t stb. transzformálunk. A transzformációt ismert módszerekkel végezzük, a transzformánsokat agar lemezekre szélesztjük és a

markereknek megfelelően szelektáljuk. A kapott telepeket restriktív elektroforetikus képük, jelzett próbához való hibridizációval vagy más ismert módszerekkel vizsgáljuk (lásd például Hanahan és Meselson, *Gene*, 10, 63-67, 1980). Az egyik módszer szerint előállítására szilárd halmazállapotú táptalajon növesztjük. A telepek sejtjeit nitrocellulóz replika szűrőre juttatjuk, majd tovább növesztjük az átvitt sejteket és lizisüket követően szárítjuk és 80 °C hőmérsékleten kezeljük. A replika szűrőt megfelelő radioizotóppal jelzett próbakkal hibridizáljuk. A különböző emlős immunglobulinok állandó szakaszaiban jelen lévő determináns kötőhelyek próbái könnyen hozzáférhetők. A telepeket az adott immunglobulin természetű vagy az adott immunglobulinban jelen lévő különböző determináns helyek alapján vizsgáljuk. A próbával hibridizálódó telepeket, azaz azokat, amelyek tartalmazzák a könnyű vagy nehéz láncot meghatározó DNS szakaszt, elkülönítjük és szelektív körülmények között tenyésztjük. A szelektív körülmények fenntartása érdekében kívánatos, hogy a használt vektor DNS biocid, előnyösen antibiotikum rezisztenciát határozzon meg. A tenyésztésből megfelelő növesztést követően, előnyösen centrifugálással elkülönítjük a sejteket. Ezután ismert módszerekkel (például Gun-salus és munkatársai, *J. Bact.*, 140, 106-133, 1979 módszerével) elkülöníthető a hibrid plazmid DNS.

Az elkülönített plazmid DNS-t restriktív endonukleáz analízissel és DNS-szekvenálással analizáljuk. Az analízis adatai bizonyítják, hogy az izolált cDNS klónok teljes mértékben kódolják a változó szakaszt és kedvező esetben az adott immunglobulin nehéz vagy könnyű láncának vezető szekvenciáját. A változó szakaszok, vezető és semleges szekvenciák restriktív térképének ismeretében meghatározhatjuk azt a restriktív helyet, ahonnan egy DNS szakaszt kihasíthatunk és módosíthatjuk abból célból, hogy vektor DNS-be építhessük és kifejezhessük az adott polipeptidet. Abban az esetben, ha a semleges régiók megfelelő pozíciójában nincs egyedülálló restriktív hely úgy részleges emésztést végzünk és szelektáljuk azokat a fragmenseket, amelyek tartalmazzák a változó régiót és előnyösen a teljes vezető szekvenciát is. Ha az 5'- és 3'-semleges szakaszok túl hosszúak, Bal 31 részleges emésztéssel rövidíthetjük azokat.

A nehéz és könnyű lánc változó szakaszainak C-terminális részén lévő kódoló szál DNS-szekvenciájának ismeretében az alábbi eljárással stop kodon építhető be a C-terminális részbe. Az *in vitro* mutagenézist úgy végezzük, hogy a cDNS-t a megfelelő enzim(ekkel) hasítjuk, amiután a változó szakaszt meghatározó szegmensen kívül 5'-3'-semleges szekvenciákat tartalmazó molekulát kapunk. Ezt a szegmenst például gélelektroforézissel, sűrűségi gradiens centrifugálással stb. tisztítjuk. Izolálást követően szétválasztjuk a szegmens két szálát, ezt forralással végezzük. Az intakt cDNS plazmid klón felesleges szálát hasíthatjuk és emésztethetjük.

Szintézissel előállítunk egy olyan egyszálú oligonukleotidot (DNS oligomert), amely legalább 12, általában 15 nukleotid bázist, de gyakran 50-nél, általában 30 nukleotidnál kevesebbet tartalmaz, mivel túl hosszú oligomerre nincs szükségünk.

Ahol ezt a szintetikus DNS oligomert használjuk a heteroduplex előállítására a nem komplementer nukleotidokat a hibridizált szállal komplementer legalább

három, gyakrabban legalább hat nukleotiddal egészítjük ki. A heteroduplex DNS oligomer komplementer a vezető-szekvencia és a változó szakasz, vagy a változó szakasz és az állandó régió közötti szakaszokkal.

A DNS oligomer gyakorlatilag komplementer a változó szakaszt kódoló (sense) szekvenciával, de tartalmaz a változó szakasz C-terminális részén egy terminációs kodont. Azaz a DNS oligomer a kódoló szálra komplementer, kivéve annál az aminosavnál, amely a változószakasz ésa könnyű és nehéz láncok D-, J- vagy C-régiójának kapcsolódási helyén, különösen pedig a D- vagy J-szakaszon vagy a J-szakaszon belül, vagy a J- és C-szakasz kapcsolódási helyén helyezkedik el. Úgy tervezünk, hogy az előállított polipeptidben bizonyos variáció jön létre a változó szakasz hosszában vagy oly módon, hogy a változó szakasz C-terminális részén lévő aminosavak közül nem tartalmazza mindegyiket.

Megfelelő szoros hibridizációs körülmények között a restriktív fragmens denaturált száljához fűlős mennyiségű DNS oligomert kapcsolunk. Így a DNS oligomer specifikus heteroduplexet alkot a kódoló szál komplementer szakaszával, ugyanakkor egy vagy több stop kodon is létrejön a megfelelő C-terminális aminosav kifejeződésének terminálisa céljából.

A megfelelő szoros hibridizációs reakciót megfelelő időn át végezzük, majd megfelelő mennyiségben adagoljuk a négy dezoxi-nukleotidot a DNS polimeráz I Klenow-fragmensével együtt. A primer enzimatis meg hosszabbításával szintetizáljuk a változó szakasz kódoló száljára komplementer és bármely 5'-irányban húzódo szekvenciát, amiután olyan szekvenciát kapunk, amely komplementer arra a szálra nézve, amelyhez a DNS-szekvenciát, amely a szintetikus oligonukleotidhoz hibridizált szakaszhoz képest 3'-irányban helyezkedik el, a DNS polimeráz 3'-5'-exonukleáz aktivitását felhasználva emésztjük. Így olyan kétszálú cDNS-t kapunk, amely specifikusan határozza meg a változó szakaszt és ellenkező irányú a könnyű és nehéz láncok túlnyomó szakaszaihoz képest. A nehéz és könnyű láncok mindegyike olyan kodont tartalmaz, amely a kifejeződést V-, D- vagy J-régiók előre meghatározott kodonja mellett megállítja.

Az előállított heteroduplex, tompa végű, kétszálú cDNS fragmenseket ezután felhasználjuk annak az egyébként homoduplex kétszálú cDNS előállítására, amely a megfelelő helyeken stop kodonokat tartalmaz és meghatározza a könnyű és nehéz változó szakaszokat.

Előnyösen úgy járunk el, hogy, vagy a fentiek szerint módosítjuk a tompa végű fragmenseket, például a változó szakasz szekvenciájában hiányzó restriktív helyeket meghatározó linkerekhez kötjük, vagy végénél meghosszabbítjuk, például poliG vagy poliC szekvenciát kapcsolunk hozzá, de felhasználhatjuk beépítésre közvetlenül is. A restriktív helyet tartalmazó linkerhez kötött fragmens megfelelő komplementer végekkel rendelkező vektor DNS-hez köthető, majd ezután adott esetben a kötőhelyek restriktív endonukleáz hasításával onnan visszanyerhető. A linkeret a tompa végű fragmensekhez megfelelő ligázzal, például T4 ligázzal kötjük, a kapott ligált fragmenst pedig kohézív végű rövidebb fragmens előállítására restriktív enzimmel kezeljük, a rövid fragmens egy vektor komplementer végeihez köthető.

Az előállított vektor DNS alkalmas amplifikálásra

és a változó szakaszt meghatározó kódoló szekvenciát tartalmazó szakaszt hordozó transzformánsok izolálására. A szokszorosításra számtalan, baktériumban létező vektor molekula áll rendelkezésünkre, például a pBR322, pSC101, pRK290, 2 μ plazmid stb. A kohézív végekkel rendelkező rövidebb fragmens vektorhoz kötése után olyan hibrid plazmidot kapunk, amely a DNS oligomer által kialakult heteroduplex-et kivéve, ahol a DNS-szekvenciák hibásak, komplementer DNS-szekvenciákat tartalmaz. A hibás szekvenciákat tartalmazó hibrid plazmid a gazdasejtben replikálódik, amikor két különböző plazmid molekula jön létre, az egyik az eredeti szekvenciájú, a másik pedig a szintetikus DNS oligomer jelenléte miatt tailored (hasított) vagy site mutated (helyileg mutált). A transzformáns telepeket külön-külön 2 ml térfogatú tenyészetekben növesztjük, a plazmid DNS-t ismert módszerekkel izoláljuk és felhasználjuk egy második transzformációs ciklusban a hasított szekvenciát replikáló klónok előállítására. A klónokat szűrő folthibridizációval választjuk ki, vagy jelzett szintetikus DNS oligonukleotiddal (például szintetikus DNS oligomert használunk a változó szakasz szekvenciájának változtatására) vizsgáljuk, vagy más előnyös módszerrel. Így olyan plazmidokat kapunk, amelyek kétszálú cDNS-e megfelelő restriktions helyeket tartalmaz és előre meghatározott helyen stop kondonnal rendelkeznek.

Meghatározott a kódoló szál 3'-terminális vége (a C-terminális aminosavat írja le), majd meghatározottá válik a kódoló szál 5'-szakasza (ez a polipeptid N-terminális részét határozza meg). A két vég módosításának sorrendjét kényelmi szempontok határozzák meg, módosítható a két vég egyszerre, ekkor a kódoló szál 5'-végén primer repair, a 3'-végén pedig helyi mutációt végzünk.

Attól függően, hogy az a gazdasejt, ahol a kifejezés megtörténik, milyen természetű, és attól függően, hogy a gazdasejt mechanizmusa eltávolítja-e a vezető szekvenciát, miután a polipeptid szekretálását elősegítő szekretáló szignálként felismert, különböző stratégiát alkalmazunk. Ha a gazdasejt nem képes a fentiekre, úgy a vezető szekvenciát meghatározó DNS szakaszt el kell távolítanunk és létre kell hoznunk a változó szakaszt meghatározó kódoló szál 5'-végén egy start kodont. Azután a rövidített szekvenciát kifejező vektorba építhetjük, mégpedig úgy, hogy egy előre meghatározott promoter és riboszomális starthely szabályozása alá kerüljön.

A vezető szekvencia szekvenciájára vagy a változó szakasz N-terminális részét meghatározó szekvenciára alapozva különböző homo- vagy heteroduplex képző oligonukleotidokat állíthatunk elő.

Ha a vezető szekvencia megmarad, a kódoló szál 5'-eltérő szekvenciájának eltávolítására primer repair használunk. Ha az N-terminális primer repair a C-terminális mutagenézissel együtt történik, az oligonukleotiddal duplex kódoló szál DNS polimerázzal kezeljük és a kapott részlegesen kétszálú DNS-t 5'-3'-egyszálú exonukleázzal kezeljük. Az 5'-eltérő szakaszok eltávolítására, majd ligázzal kezelve hozzákötjük a replikálódó szálát az N-terminális oligonukleotidhoz.

Ha eltávolítjuk a vezető szekvenciát, in vitro mutagenézissel alakítjuk ki a változó szakaszt meghatározó DNS-szekvencia N-terminális részén az iniciációs kodont (ATG az N-formil-metionin esetén).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Az előnyös kétszálú cDNS izolálására in vitro mutagenézis végzésére többféle módon járhatunk el. Ha a kódoló szekvenciától távolosó restriktions helyek léteznek, a plazmidot a megfelelő restriktions endonukleázzal emésztjük, majd az emésztést kétszálú DNS-t hasító exonukleázzal, például Ba131-el folytatjuk. A kapott kétszálú cDNS klónozható és a megfelelő szekvencia szelektálható és módosítható, ahogy azt a fentiekben megadtuk. Ha a kódoló szál 5'-végén lévő nem kódoló szakasz túl hosszú, ez endonukleázzal emészthető, ha megfelelő restriktions hely létezik, de végezhető az emésztés exonukleázzal is, például Ba131-el.

A fenti, a 3'-terminális vég módosítására használt eljárást megismételve a változó szakaszokat meghatározó DNS szekvencia 5'-terminális vége hasítható, jelen esetben az oligonukleotid komplementer a nem kódoló (nonsense) szállal, és az 5'-végén (primer repair) vagy az oligonukleotidban (in vitro mutagenézis) iniciációs kodont tartalmaz. Közönséges körülmények között is az oligonukleotid homoduplexet primer repairhoz, a heteroduplexeket in vitro mutagenézisre használjuk. Így olyan hasított kétszálú cDNS-t kapunk, amely az immunoglobulinok könnyű és nehéz láncainak változó szakaszát meghatározó, alkalmasan elhelyezkedő start és stop kodonokat tartalmaz. A kapott tompa végű kétszálú cDNS módosítható, például úgy, hogy linkereket kötünk hozzá kifejezhető vektorba való beépítést megengedő komplementer végek előállítására. A beépítés úgy történik, hogy a vektor megfelelő orientációban tartalmazza a beépített szakaszt a kétszálú cDNS-hez kapcsolt vagy a vektorban jelenlévő szabályozó szignálhoz képest.

Az előállított kétszálú cDNS-t kifejező vektorba építjük. A korábbi vektorokkal ellentétben, mivel ezek csak a kétszálú cDNS replikációját tették lehetővé, a jelen kísérleti stádiumban használt molekulának tartalmaznia kell a transzkripció és a transláció szabályozó jeleket.

A megfelelő promotert és más transzkripció szabályozó szignál-szekvenciákat, például operátort, attenuatort, aktivátort, tartalmazó vektort választunk. A vektort legalább részben szekvenálnunk kell ahhoz, hogy legalább egy beépülési helyet meghatározhasunk, ahova a változó régiókat meghatározó cDNS-t a szabályozó jelek kontrollja alá építhetjük be.

A transzkripció szabályozó jelek mellett léteznek, ahogy azt már közöltük, translációs szabályozó jelek is, elsősorban a riboszóma kötőhely (Shine-Dalgarno-szekvencia, S-D) és az iniciációs kodon (formil-met kodon). Az S-D szekvenciának és az iniciációs kodonnak megfelelően kell elhelyezkednie, általában 3-12 bázispár távolságban. Az S-D szekvencia a vektorba egy beépülési helyhez képest megfelelő pozícióban lehet, de hozzá is kapcsolható a változó szakaszt meghatározó kódoló szekvenciához, például az S-D-szekvenciát biztosító oligonukleotid lizálásával és egy megfelelő restriktions hely létrehozásával az S-D-szekvenciát követően. Az S-D-szekvencia in vitro mutagenézissel is kialakítható, ahogy azt az előzőekben már megadtuk. A kódoló szekvencia leolvasási fázisban kell hogy legyen az iniciációs kodonnal.

A választott stratégia attól függ, hogy a kódoló szekvencia és az ezen kívüleső régiók tartalmaznak-e vagy sem restriktions helyeket. Függetlenül, hogy milyen vektor áll rendelkezésünkre a kétszálú cDNS-szekvencia beépítésére és a polipeptid változó szak-

szának kifejezésére, függ a felhasználható kifejeződő vektor hozzáférhetőségétől, a jó kitermelést biztosító, az információt kifejező gazdasejtől és függ, hogy rendelkezünk-e olyan gazdasejttel, amely képes felismerni például a szekretálást biztosító jeleket, hogy biztosítható legyen a vezető szekvencia lehasítása. Így minden helyzetben és minden egyes idiotípus esetén meg kell állapítanunk a változó és ezen túlmenő régiókat meghatározó DNS-szekvencia legalább egy részének restriktions térképét.

Ha a vektor végei és a beépítendő szekvencia végei hasonlóak, meg kell vizsgálnunk, hogy az adott szekvencia jó, azaz nem rossz orientációban épült be. A beépítést követően kapott klónozott plazmidok térképezésével kiválaszthatjuk azt a plazmidot, amely a változó szakaszt meghatározó szekvenciát megfelelő orientációban tartalmazza.

A fenti stratégia több fontos előnnyel jár. A polipeptid láncokat azonos szekvenciákat és azonos lánc-hosszúságú szálakat tartalmazó homogén készítményként kapjuk. Az rFv-1 alkotó polipeptidok cukormentesek és ezért, további homogenitásuk, miatt egységesen jelezhetők vagy módosíthatók. Így a termék egységes és reprodukálható tulajdonságú anyagként kapjuk meg. A termék emlísenek megbízhatóan adagolható és viszonylag enyhe mellékhatásokat vált ki, amelyek heterogén termék adagolásakor jelentkezhetnek.

Az alábbiakban az eljárás az oldalmi kör korlátozása nélkül, példában szemléltetjük.

A példában jellemző ligandként a dinitro-fenilt adjuk meg. A találmány szerinti eljárást természetesen bármely ligandra felhasználhatjuk, bár a szóba jövő idiotípusok nagy száma miatt az eljárás bizonyos szakaszait egy adott restriktions hely vagy más jellemzők miatt részben módosítanunk kell.

Példa

A dinitro-fenil (DNP) monoklónozott antitestjeinek előállítása

10,5 pH-jú vizes pufferban 10 mM 2,4-dinitro-benzol-szulfonátot oldunk (lásd Eisen és munkatársai, J.A.C.S., 75, 4583, 1953) és az oldathoz 0,01 mM hemocianint adunk, majd 20 órán át szobahőmérsékleten rázzuk az elegyet. Ezt követően 0,6 M nátrium-klorid oldattal szemben többször dializáljuk, az oldatot a maradékot immunizálásra elkülönítjük.

100 µg így előállított DNP immunogént 0,1 ml komplett vagy inkomplett Freund-adjuvánsal és 0,1 ml per dózis mennyiségű PEs-sel (polietilén-nátrium-szulfonát) keverjük. Hat BALB/c egeret injektálunk egy-egy dózissal, hetenkénti adagolással, az injekciókat intraperitoneálisan és szubkután adjuk a talpba és az inguinális területre. Az első injekciót komplett, a többi hármat inkomplett Freund-adjuvánsal adjuk. Az utolsó injekciót követő harmadik napon leöljük az egereket, izoláljuk a lépelt és monoklónozott antitestek képzésére használjuk fel.

A fúziót úgy végezzük, hogy 3×10^7 Sp2/O-Ag14 mellelona sejtet (Shulman és munkatársai, Nature, 276, 269-270, 1978) és 5×10^7 lépsejtet egyesítünk és a sejtszuszpenziót 5 percen át 200 g-n centrifugáljuk, majd óvatosan 0,6 ml 50%-os polietilén-glikol 1500 oldatban (az oldatot Dulbecco módosított Eagle-táptalajával készítjük, Flow) újra szuszpendáljuk. 1 perc múlva 20 ml, 37 °C hőmérsékletű R táptalaj adunk

(RPMI 1640 táptalaj, Gibco, amit 30 mM Hepes oldattal, Flow, egészítünk ki). Centrifugáljuk a sejteket és 20 ml R táptalajban szuszpendáljuk, amit előzőleg 10% borjú szérummal (Gibco) (RF táptalaj) egészítünk ki. 0,2–0,2 ml sejtszuszpenziót 0,8 ml RF táptalajt tartalmazó, 200 db csövecskébe mérünk. 100 db csövecske 2×10^5 egér peritoneális sejtet is tartalmaz. 24 órán át inkubáljuk a sejteket, majd mindegyik csövecskébe 1 ml, HAT táptalajjal kiegészített RF táptalajt mérünk. Minden 2–3. napon 1 ml táptalajt friss RF+GAT táptalajjal cserélünk ki. Két hét múlva a növekvő sejteket immunglobulin termelésre vizsgáljuk, a vizsgálatot ^{35}S -2,4-dinitro-fenil-szulfonamid-lizinnel végezzük. A specifikus aktivitást adó klónokat lágyagaron klónozzuk anti-DNP előállítására.

Eljárhatunk Herzenberg és munkatársai módszere szerint is (J. Exp. Med., 151, 1071-1087, 1980). E szerint a DNP-szubsztituált marha szérum albumint RIA hígítóval (1% BSA, 0,005 M EDTA és 0,1% NaN_3 7,6 pH-jú PBS-ben) adagolunk a mikrolemez csövecskéibe, és 1 órán át inkubáljuk a lemezt, majd vizsgáló és standard antiszérumot adunk a csövecskéékhez, megfelelő hígítás után (20 µl/cső) és 1 órán át folytatjuk az inkubálást. Háromszor RIA hígítóval mossuk a lemezeket, majd ^{125}I -jelzett anti-egér immunglobulint adagolunk 2×10^5 cpm/cső mennyiségben és 1 órán át inkubálunk. Ezután háromszor RIA hígítóval mossuk a lemezeket, szárítjuk és autoradiografiát végzünk.

Az antitestek detektálására mindkét fenti módszer jól ismert. Ezután klónozzuk a sejteket, vagy hígítást követően vagy lágyagaron és a klónozott sejtvonalaikat szaporítjuk és folyékony nitrogén alatt fagyaszttva tároljuk felhasználásig.

Egy liter tenyészetet készítünk egy pozitív klónozott sejtvonalból, a tenyészet milliliterenként 1×10^6 sejtet tartalmaz. Centrifugálással összegyűjtjük a sejteket, majd 1 g-ot 16 ml guanidium-tiocianát törzsolatban (4 M, 50 g guanidium-tiocianát, 0,5 g nátrium-N-lauril-szarkozinát, 2,5 ml 1M nátrium-citrát, pH 7,0, 0,7 ml 2-merkaptó-etanol és 0,5 ml 30%-os Antifoam A (Sigma) keverése után az oldatot 100 ml-re töltjük fel) szuszpendálunk, a szuszpenziót 55 ml-es Potter-Elvehjen homogenizátorba töltjük és 30–60 másodpercen át homogenizáljuk teljes fordulatszámmon, 18 mm átmérőjű Tissumizer homogenizálóban (Tekmar-Industries). A kapott homogenizátumot 10 percen át percnkénti 8000-es fordulattal centrifugáljuk, 10 °C hőmérsékleten Sorval HB4 lengő rotorban. A felülúszót lombikba töltjük, 0,024 térfogat (a homogenizáló puffer eredeti térfogatára számítva) 1 M ecetsavval keverjük a 7-es pH 5-re csökkentésére, majd 0,75 térfogat vízmentes etanolt adagolunk. Lezárjuk a lombikot és erőteljesen rázzuk, majd egy éjszakán át -20 °C hőmérsékleten tároljuk. Ezután 10 percen át -10 °C hőmérsékleten 6000 fordulatszám/perccel centrifugáljuk HB4 rotorban a termék elkülönítésére.

A csapadékot elkülönítjük és erőteljes rázás közben 0,5 térfogat pufferolt guanidin-hidrogén-klorid törzsolatban (7,5 M, semlegesített, majd 0,25 térfogat 1 M nátrium-citráttal pufferolt oldat, pH 7,0, 5 mM ditio-treitol) szuszpendáljuk. 68 °C hőmérsékletű vízfürdőben rövid időn át melegítjük a szuszpenziót, amikor diszperziót kapunk. 0,025 térfogat (gua-

nidin-hidrogén-kloridra számítva), 0,5 térfogat etanolban oldott 1M ecetsav oldattal kicsapjuk a csapadékot. Legalább három órán át -20 °C hőmérsékleten tartjuk a szuszpenziót, majd centrifugáljuk. A csapadékot guanidin-hidrogén-kloridban szuszpendáljuk és fentieket megismételve újra kicsapjuk. Az ismételt kivált csapadékot percenként 6000-szer forduló rotorban 5 percen át centrifugáljuk, majd ezután mindent steril körülmények között végzünk.

A végső csapadékot szobahőmérsékleten etanolban diszpergáljuk, a fölös guanidin-hidrogén-klorid eltávolítására extraháljuk, majd 5 percen át 6000 fordulattal centrifugáljuk. Az etanolt nitrogénáramban desztilláljuk és az RNS üledéket erőteljes rázás közben vízben oldjuk. 10 percen át 10 °C hőmérsékleten 13 000 percenkénti fordulatszám mellett centrifugálunk, az RNS-t tartalmazó felülúszót dekantáljuk. Az RNS-teljes extrakciójára kétszer 0,5 ml steril vízzel újra extraháljuk az oldhatatlan anyagot, az extraktumot 10 percen át 10 °C hőmérsékleten percenkénti 130 000 fordulatszámú rotorban centrifugáljuk és egyesítjük a vizes oldatokat. Ezt 0,1 térfogat pH5-ös, 2 mólos kálium-acetát/ecetsav pufferral és 2 térfogat etanollal keverjük, és egy éjszakán át -20 °C hőmérsékleten állni hagyjuk.

Centrifugálással elkülönítjük az RNS-t az etanolos szuszpenzióból, a centrifugálást 20 000 fordulat/perc fordulatszámú rotorban végezzük 20 percen át -10 °C hőmérsékleten, Corex csövekben (HB4 rotor). A csapadékot 95%-os etanollal erőteljesen mossuk, nitrogénáramban szárítjuk, és 1 ml/g sejt mennyiségű, 10 mM trisz-puffert, pH 7,5, 1mM EDTA-t és 0,2% SDS-t tartalmazó elegyben oldjuk. Az RNS oldódása után 1/9 térfogat 5 mólos nátrium-kloridot adagolunk és az oldatot oligo-(dT)-oszlopra (0,5 g száraz súly, T3 grade, Collaborative Research) öntjük. Az oszlopot az alábbi összetételű eleggyel erőteljesen mossuk, 0,5 M nátrium-klorid, 10 mM trisz, 1mM EDTA, pH 7,5, 0,2% SDS, majd a mosás után 10 mM trisz, 1mM EDTA, pH 7,5 és 0,05% SDS eleggyel eluáljuk. Az eluációt λ 260-on hullámhosszon ellenőrizzük. Az UV-elnyelő frakciókat összegyűjtjük és ecetsav-nátrium-acetát, pH 5, puffer és 2,5 térfogat etanol adagolásával kicsapjuk. A szárított üledéket 50 μ l 1 térfogat 10 mM trisz, pH 7,5, 1 mM EDTA elegyben oldjuk és 9 térfogat dimetil-szulfoxidot adagolunk, majd közvetlenül ezután 1 térfogat pufferezett 1 mólos lítium-klorid oldatot (1 M lítium-klorid, 50 mM EDTA, 2,0% SDS, 10 mM trisz, pH 6,5). Az oldatot 5 percen át 55 °C hőmérsékleten tartjuk, 100 térfogat kötő puffert adagolunk hozzá, majd oligo-dT-cellulóz oszlopra öntjük, amit kötő pufferral (0,5 M nátrium-klorid 10 mM trisz, 1 mM EDTA, 0,2% SDS) egyensúlyoztuk ki. Az eluálást az előzőekben megadottak szerint végzük.

A monoklónozott immunglobulin polipeptidek könnyű és nehéz láncait meghatározó mRNS jelenlétét hibrid szelekcióval bizonyítjuk, a megfelelő nehéz és könnyű láncokat leíró gének (lásd Early és Hood, Genetic Engineering, 3. kötet, 1981, Setlow és Hollander, Plenum Publishing Corp., 157-188. oldal) DNS klónjait használva. A DNS próbákat a közölt aminosav- vagy DNS-szekvenciák alapján szintézissel állítjuk elő, vagy más forrásból nyerjük (lásd Early és Hood, mint fent). A DNS próbákat denaturáljuk, semlegesítjük és nitrocellulóz szűrőpapírhoz kötjük.

(Schleicher és Schnell BA-85-R 597) a Southern féle módszert használva (J. Mol. Biol., 98, 503-517, 1975). A kísérletet 10-szer tömény standard citráttal végzük (lásd még a 4 302 204 számú amerikai egyesült államokbeli leírást). A próbákat 30 μ g mRNS-hez hibridizáljuk 100 μ l végtérfogatú reakcióelegyben 50 °C hőmérsékleten, 2 órán át. A reakcióelegy összetétele: 65% formamid/10 mM puffer, pH 6,4, 0,4 M nátrium-klorid. 10 másodpercig microfugában centrifugáljuk a reakcióelegyet, vortexeljük, ismét centrifugáljuk, majd gyengén vortexeljük a szűrőpapírok szuszpendálására. 1 órán át gyenge keverés közben 50 °C hőmérsékleten inkubáljuk a reakcióelegyet. Ezután az oldatot eltávolítjuk, a szűrőket tízszer 1 ml alábbi összetételű eleggyel mossuk: 0,15 M nátrium-klorid, 0,15 M nátrium-citrát, 0,5% nátrium-dodoxilszulfát. A mosópuffer hőmérsékletét 60 °C-on tartjuk. A mosófoliadékok adagolása közben több másodpercen át vortexeljük a csöveket. Ezután kétszer 10 mM trisz, pH 7,8 és 2 mM EDTA eleggyel 1 ml-rel mossuk a szűrőket, majd 5 percen át 60 °C hőmérsékleten inkubáljuk, és levegőztetéssel eltávolítjuk az oldatot.

Az RNS-DNS hibridről az RNS-t úgy eluáljuk, hogy a szűrőket 60 másodpercen át 300 μ l kétszer desztillált, steril vízben forraljuk, majd metanol-száraz jég fürdőben gyorsan fagyaszttjuk. Jégen felolvasszjuk az oldatot, az RNS-t tartalmazó vizet egy másik csőbe juttatjuk, 0,2 M végkoncentrációban nátrium-acetátot adagolunk és 20 μ g borjú thymus tRNS-t adagolunk. 2,5 térfogat etanollal -20 °C hőmérsékleten kicsapjuk az RNS-t és közvetlenül transzláció előtt 12 000 g-n 10 percig, 4 °C hőmérsékleten centrifugálva ülepitjük. Az üledéket kétszer 70%-os etanollal mossuk, majd csökkentett nyomáson szárítjuk.

Az eluált RNS-t in vitro transzlátáljuk nyúl reticulocita sejtmentes lizátumban, például a New England Nuclear transzlációs rendszert használva, amúttán a rendszerhez adott melléklet szerint detektáljuk a protein szintézist.

Monoklónozott antitestekkel alikvot mintákat inkubálunk, úgy, hogy az in vitro transzlációs lizátumban lévő kifejeződő termék feleslegben legyen jelen. Az antitest-antigén komplexet rögzített S. aureus-szal kicsapjuk és háromszor pH 8,3, 0,05 M trisz, 0,45 M nátrium-kloridot és 0,5% NP40-t tartalmazó eleggyel mossuk a csapadékot, 0,01 mólos nátrium-foszfát pufferben (pH 7,5) forraljuk, a pufferhez előzőleg 1% β -merkaptó-etanol adunk. A mosás után 5-20%-os gradiens SDS-poliakril-amid gélen elektroforézist végzünk 125 V feszültségen, mindaddig, míg a brómfenolkék jel eléri a gél végét és plusz 1 órát. Szárítjuk a gél, fixáljuk és az immunoglobulin könnyű és nehéz láncait meghatározó mRNS kimutatására Kodak X-R filmet használva fotózzuk. Az így kapott mRNS keverékkel Okayama és Berg módszerét (Molecular and Cellular Biology, 1982 február, 161-170. oldal) használva kétszálú cDNS sorozatot állítunk elő. Először megadjuk a vektor primer és az oligo-dG-t tartalmazó linker DNS előállításának módját.

400 μ g pBR322-SV40 (térfépegység 0,71-0,86) DNS-t az alábbi összetételű, 0,4 ml térfogatú reakcióelegyben, 37 °C hőmérsékleten 700 egység KpnI endonukleázzal kezelünk: 5 mM trisz-hidrogén-klorid, pH 7,5, 6 mM magnézium-klorid, 6 mM nátrium-klorid, 6 mM 2-merkaptó-etanol és 0,1 mg/ml marha szérum albumin (BSA). 5 órás kezelést követően 40 μ l

0,25 mólos EDTA (pH 8,0) és 20 µl 10%-os SDS adagolásával leállítjuk a reakciót. A protein eltávolítására vízzel telített fenol és kloroform (1:1) eleggyel extraháljuk az oldatot, majd etanollal kicsapjuk a DNS-t.

A KpnI endonukleázzal előállított végekhez 60, de nem több, mint 80 dT-csoportot kapcsolunk (végenként) borjú thymus terminális dezoxi-nukleotidil-transzferázzal. Úgy járunk el, hogy 0,2 ml reakcióelegy előállítására 140 mM nátrium-kakodilátot 30 mM trisz-hidrogén-kloridot (pH 6,8), 1 mM kalcium-kloridot, 0,1 mM ditio-treitol, 0,25 mM DTTP-t, KpnI endonukleázzal emésztett DNS-t és 400 egység terminális dezoxi-nukleotidil-transzferázt tartalmazó oldatot készítünk. 30 percen át 37 °C hőmérsékleten végezzük a reakciót, majd 20 µl 0,25 mólos EDTA (pH 8,0) és 10 µl 10%-os SDS adagolásával leállítjuk, a DNS-t pedig fenol és kloroform 1:1 arányú eleggyel végzett extrakciókat követően etanollal kicsapjuk. 17 egység HpaI endonukleázzal emésztjük az izolált DNS-t, az emésztést 0,2 ml, 10 mM trisz-hidrogén-kloridot (pH 7,4), 10 mM magnézium-kloridot, 20 mM kálium-kloridot, 1 mM ditio-treitol és milliliterenként 0,1 mg BSA-t tartalmazó reakcióelegyben végezzük 5 órán át, 37 °C hőmérsékleten.

A pBR322 DNS replikációs origóját és az ampicillin rezisztenciát meghatározó gént tartalmazó nagy DNS fragmens 1% agarózt tartalmazó gélen elektroforézist végezve tisztítjuk, a gélről Vogelstein és Gillespie (PNAS USA, 76, 615-619, 1979) üvegporos módszerének módosított változatával izoláljuk a DNS-t.

A dT-végű DNS-t oligo-dA-cellulóz oszlopra adszorbeálva és eluálva az alábbiak szerint tovább tisztítjuk: a DNS-t 1 mM EDTA-t és 1 M nátrium-kloridot tartalmazó 10 mM-os trisz-hidrogén-klorid (pH 7,3) pufferben oldjuk, 0 °C hőmérsékletre hűtjük, és 0,6x2,5 cm méretű, 0 °C hőmérsékleten hasonló pufferral kiegyensúlyozott oligo-dA-cellulóz oszlopra öntjük az oldatot, 0 °C-on hasonló pufferral mossuk az oszlopot és szobahőmérsékleten vízzel eluáljuk. A 14 µg-nyi eluált DNS-t etanollal kicsapjuk és 10 mM trisz-hidrogén-klorid (pH 7,3) és 1 mM EDTA eleggyel 100 µl-ében oldjuk.

Az oligo-dG-végű linker DNS előállítására 100 µg pBE322-SV40 (térfogegység 0,19-0,32) DNS-t 120 egység PstI endonukleázzal emésztünk 0,2 ml alábbi összetételű reakcióelegyben: 6 mM trisz-hidrogén-klorid (pH 7,4), 6 mM magnézium-klorid, 6 mM 2-merkapto-etanol, 50 mM nátrium-klorid és 0,1 mg/ml NSA. A reakciót 1,5 órán át 37 °C hőmérsékleten végezzük, majd a reakcióelegyet fenol és kloroform 1:1 arányú eleggyel extraháljuk és a DNS-t alkohollal kicsapjuk. Ezt követően a végekhez 10-15 dG-csoportot kapcsolunk 50 µl az előzőekben megadott összetételű, de a dTTP helyett 0,1 mM dGTP-t tartalmazó reakcióelegyben 60 egység terminális dezoxi-nukleotidil-transzferázzal. A reakciót 20 percen át 37 °C hőmérsékleten végezzük, majd fenol és kloroform 1:1 arányú eleggyel extraháljuk az elegyet, a DNS-t etanollal kicsapjuk és 50 µl, alábbi összetételű reakcióelegyben 50 egység Hind III endonukleázzal hasítjuk 20 mM trisz-hidrogén-klorid (pH 7,4), 7 mM magnézium-klorid, 60 mM nátrium-klorid és 0,1 mg/ml BSA. A kisméretű, oligo-dT-végű linker DNS-t 1,8% agarózt tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítjuk és az előzőekben megadottak szerint izoláljuk.

Előállítjuk az alábbi reakcióelegyet (térfogata

5 10 µl 50 mM Trisz-hidrogén-klorid (pH 8,3), 8 mM magnézium-klorid, 30 mM kálium-klorid, 0,3 mM ditio-treitol, 2 mM DATP, dTTP, dGTP és P³²-dCTP (850 beütés/perc/pmol), 0,2 µg mRNS (körülbelül 2-3 szoros feleslegben a primer végekhez képest), 1,4 µg vektor primer DNS (0,7 pmol primer vég) és 5 egység reverz transzkriptáz. (A poliA mRNS molaránya a vektor primer DNS-re számítva 1,5:1 és 3:1 közötti).

10 A cDNS szintézisét a reverz transzkriptáz adagolásával indítjuk meg és 37 °C-on 20 percen át folytatjuk. Ekkor a dCTP beépülés csökken és a primer több, mint 60%-a felhasználódott a cDNS szintéziséhez. 1 µl 0,25 M EDTA (pH 8,0) és 0,5 µl, 10%-os SDS adagolásával leállítjuk a reakciót, az elegyet fenol és kloroform 1:1 arányú eleggyel vortexeljük, majd centrifugáljuk. A vizes fázishoz 10 µl 4 M ammónium-acetátot és 40 µl etanolt adunk, száraz jég között 15 percen át hűtjük, a hűtés közben kivált nem reagált dezoxi-nukleozid-triofoszfátok oldására enyhén rázunk, majd Eppendorf mikrofugában 10 percen át centrifugáljuk. A csapadékot 10 mM trisz-hidrogén-kloridot (pH 7,3) és 1 mM EDTA-t tartalmazó elegy 10 µl-ében oldjuk, az oldathoz 10 µl 4 mólos ammónium-acetát oldatot keverünk és 40 µl etanollal újra kicsapjuk, majd etanollal mossuk a csapadékot.

25 A cDNS: mRNS plazmidot tartalmazó csapadékot 15 µl, 1 mM kobalt-kloridot, 0,1 mM ditio-treitol, 0,2 µg poli-A-t, 66 µM P³²-dCTP-1 (600 beütés/perc-pmol) és 18 egység terminális dezoxi-nukleotidil-transzferázt tartalmazó 6,8 pH-jú 140 mM nátrium-kakodilát-30 mM trisz-hidrogén-klorid elegyben oldjuk. A reakciót 37 °C hőmérsékleten végezzük 5 percen át, amikor 10-15 dCMP kötődik a molekulák végéhez. A reakciót 1,5 µl 0,25 M EDTA (pH 8,0) és 0,75 µl 10%-os SDS adagolásával állítjuk le. 15 µl fenol-kloroform eleggyel (1:1) extraháljuk az elegyet, és 15 µl 4 M-os ammónium-acetáttal keverjük, majd 60 µl etanollal kicsapjuk, és ismételtén kicsapjuk, és végül a csapadékot etanollal mossuk.

30 A csapadékot 20 mM trisz-hidrogén-kloridot (pH 7,4), 7 mM magnézium-kloridot, 60 mM nátrium-kloridot és 0,1 mg/ml BSA-t tartalmazó, 10 µl térfogatú pufferben oldjuk, majd 2,5 egység HindIII endonukleázzal emésztjük 37 °C hőmérsékleten, 1 órán át. 1 µl 0,25 M EDTA (pH 8,0) és 0,5 µl 10%-os SDS adagolásával leállítjuk a reakciót, majd fenol és kloroform-acetátot adagolunk és a DNS-t 40 µl etanollal kicsapjuk. A csapadékot etanollal mossuk és 10 mM trisz-hidrogén-kloridot (pH 7,3) és 1 mM EDTA-t tartalmazó elegy 10 µl-ében oldjuk, végül 3 µl etanolt adunk hozzá, hogy -20 °C hőmérsékleten tárolva ne fagyjon meg.

45 0,02 pmol (1 µl) HindIII endonukleázzal emésztett oligo-dC-végű cDNS: mRNS plazmidot 10 µl, alábbi összetételű elegyben inkubálunk 2 percig, 65 °C-on: 10 mM trisz-hidrogén-klorid (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,1 M nátrium-klorid és 0,04 pmol oligo-dG-végű linker DNS (ez a mennyiség egyszerűes moláris felesleget jelent a kétszálú cDNS, mRNS-re és a HindIII endonukleázzal való fentiek szerinti emésztést követően kapott fragmensre számítva). Az inkubálást 30 percen át 42 °C hőmérsékleten folytatjuk, majd 0 °C-ra hűtjük. 10 µl elegyhez annyi alábbi összetételű elegyet adunk, hogy térfogata 100 µl legyen: 20 mM trisz-hidrogén-klorid (pH 7,5), 4 mM magnézium-klorid, 10 mM ammónium-szulfát, 0,1 M kálium-

-klorid, 50 µg/ml BSA és 0,1 mM β-NAD. Az elegyhez 0,6 µg E. coli DNS-ligázt adunk és egy éjszakán át 12 °C hőmérsékleten inkubálunk.

A kétszálú cDNS: mRNS szálának kicserélésére a ligációs elegyhez 40–40 µM-t adunk a négy dezoxi-nukleotid-trifoszfátból, továbbá 0,15 mM β-NAD-ot, 0,4 µg további E. coli DNS-ligázt, 0,3 µg E. coli DNS-polimeráz I-et és 1 egység E. coli RNáz H-t adagolunk. A 140 µl térfogatú reakcióelegyet 12 °C-on, majd szobahőmérsékleten inkubáljuk 1–1 órán át, amikor létrejön a repair szintézis és a Poli katalizált nick-transzláció. A reakciót 0,9 ml hideg, 10 mM-os trisz-hidrogén-klorid (pH 7,3) adagolásával leállítjuk és 0,1 ml alikvótokat tárolunk 0 °C hőmérsékleten.

A transzformációt Cohen és munkatársai által leírt (PNAS USA, 69, 2110-2114, 1972) némileg módosított módszerét használva végezzük el. Az E. coli K12 HB101 törzset 37 °C hőmérsékleten növesztjük 20 ml standard L-táptalajban. A növesztést addig folytatjuk, míg λ 600 hullámhosszon az OD 0,5. Centrifugálással összegyűjtjük a sejteket, 10 ml, 5 mM kalcium-kloridot tartalmazó 10 mM-os trisz-hidrogén-kloridban (pH 7,3) szuszpendáljuk és 5 percen át 0 °C hőmérsékleten centrifugáljuk. A sejteket 2 ml fenti összetételű pufferban szuszpendáljuk és 5 percen át 0 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Ezután 0,2 ml sejtszuszpenziót 0,1 ml DNS- oldattal keverünk, és 15 percen át 0 °C hőmérsékleten inkubálunk. 2 percig 37 °C, majd 10 percen át szobahőmérsékleten tartjuk a szuszpenziót, majd 0,5 ml standard L-táptalajt adagolunk hozzá, 30 percen át 37 °C-on inkubálunk és ezt követően 50 µg/ml ampicillint tartalmazó agarlemezeken lévő nitrocellulóz szűrőkre szélesztjük. 12-24 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubálunk, majd az E. coli transzformánsokat Grunstein és Hogness in situ telephibridizációs módszerével megvizsgáljuk, tartalmaznak-e könnyű és nehéz láncot meghatározó cDNS-t. A három replika nitrocellulóz szűrőkoronon több ezer transzformáns nő, ezeket lúggal lízáljuk, és az előzőekben megadottak szerint próbákkal hibridizáljuk az immunglobulin láncok nehéz és

5

10

15

20

25

30

35

könnyű szakaszainak konstans régióit keresve. Az immunglobulin könnyű és nehéz láncait meghatározó géneket tartalmazó klónokat azonosítjuk. A pozitív hibridizációs jelet adó telepeket egy liter, 50 µg/ml ampicillint tartalmazó L-táptalajban tenyészítjük és a plazmid DNS-t ismert módon izoláljuk (Gunsalus és munkatársai, J. Bact., 140, 106-113, 1979).

Az előzőekben megadottak szerint eljárva lízáljuk a sejteket, a lízátumot centrifugáljuk és a tiszta oldatot azonos térfogatú vízzel hígítjuk. Milliliterenként 50 µg RNáz A-t adagolunk, majd egy órán át 37 °C hőmérsékleten inkubálunk. Ezután 0,3 térfogat, TE-pufferral (10 mM trisz-hidrogén-klorid, pH 7,9 1 mM EDTA) telített fenollal extraháljuk az oldatot, majd 4 °C hőmérsékleten 10 percen át 16 000 g-n centrifugáljuk. A vizes fázist elkülönítjük, 1 M végkoncentrációra nátrium-kloriddal egészítjük ki és 2 térfogat etanollal kicsapjuk a DNS-t. Több órán át -20 °C-on tartjuk a szuszpenziót, majd 10 000 g-n, 4 °C hőmérsékleten 20 percen át centrifugálva elkülönítjük a kivált DNS-t.

A cDNS klónokat restriktív enzimekkel térképezük, illetve szekvencia-analízist végzünk ismert módszerekkel. A kapott restriktív térkép segítségével a változó szakaszokat meghatározó cDNS oly módon manipulálható, hogy az klónozható és kifejezhető lesz. A fentiekhez Maxam és Gilbert (Methods Enzymol., 65, 499-560, 1980), illetve Sanger és munkatársai, (J. Mol. Biol., 143, 161-178, 1980) módszereit használjuk a könnyű és nehéz láncok teljes változó régióit és a vezető szekvenciákat meghatározó cDNS klónokat.

Izoláljuk, szekvenáljuk és manipuláljuk például a MOPC41 K-láncát (könnyű lánc) és a myeloma S107 nehéz láncát.

Az alábbiakban megadjuk a MOPC41-K-láncának szekvenciáját, ahol a vezetőt, a változó régiót és konstans szakaszt pontokkal választottuk el. A konstans szakasznak csak az első tizenhat aminosavát jelöljük (Nature, 280, 370-375, 1979, Seidman és munkatársai).

```

Met ASP Met Ala Pro Ala
... TCA GGA CTC AGC ATG GAC AGG GCT CCT GCA

Gln Ile Phe Gly Phe Leu Leu Leu Phe Gln Gly
CAG ATT TTT GGC TTC TTG TTG CTC TTG TTT CAA GGT

Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
ACC AGA TGT ... GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Ser
TCC TCC TTA TCT GCC TCT CTG GGA GAA AGA GTC AGT

Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Ser
CTC ACT TGT CGG CCA AGT CAG GAC ATT GGT AGT AGC

Leu Asn Trp Leu Gln Gln Glu Pro Asp Gly Thr Ile
TTA AAC TGG CTT CAG GAG GAA CCA GAT GGA ACT ATT

Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser
AAA CGC CTG ATC TAC GCC ACA TCC AGT TTA GAT TCT

Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly
GGT GTC CCC AAA AGT TTC AGT GGC AGT AGG TCT GGG

```

196.842

Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
TCA GAT TAT TCT CTC ACC ATC AGC AGC CTT GAG TCT

Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala
GAA GAT TTT GTA GAC TAT TAC TGT CTA CAA TAT GCT

Ser Ser Pro Trp The Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
AGT TCT CCG TGG AGG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
GAA ATC AAA CGT ... GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA

Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT GAG CAG ...

Az alábbiakban a myeloma S107 nehéz lánc változó régiójának nukleotid-szekvenciáját adjuk meg, ahol pontokkal választjuk el a vezető-szekvenciát, a változó és állandó régiót. A konstans szakasznak csak az első kilenc aminosavát adjuk meg (Early és munkatársai., Cell, 19, 981-992, 1980).

20

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Val Phe Leu Leu Thr Leu
ATG AAG TTG TGG TTA AAC TGG GTT TTT CTT TTA ACA CTT

Leu His Gly Ile Gln Cys ... Glu Val Lys Leu Val Glu
TTA CAT GGT ATC CAG TGT ... GAG GTG AAG CTG GTG GAA

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
TCT GGA GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGT TCT CTG AGA

Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe
CTC TCC TGT GCA ACT TCT GGG TTC ACC TTC AGT GAC TTC

Tyr Met Glu Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Arg Leu
TAC ATG GAG TGG GTC CGC CAG CCT CCA GGG AAG AGA CTG

Glu Trp Ile Ala Ala Ser Arg Asn Lys Ala Asn Asp Tyr
GAG TGG ATT GCT GCA AGT AGA AAC AAA GCT AAT GAT TAT

Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile
ACA ACA GAG TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGT CGG TTC ATC

Val Ser Arg Asp Thr Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln
GTC TCC AGA GAC ACT TCC CAA AGC ATC CTC TAC CTT CAG

Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
ATG AAT GCC CTG AGA GCT GAG GAC ACT GCC ATT TAT TAC

Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe
TGT GCA AGA GAT TAC TAC GGT AGT AGC TAC TGG TAC TTC

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Thr Val Tyr
... GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT ...

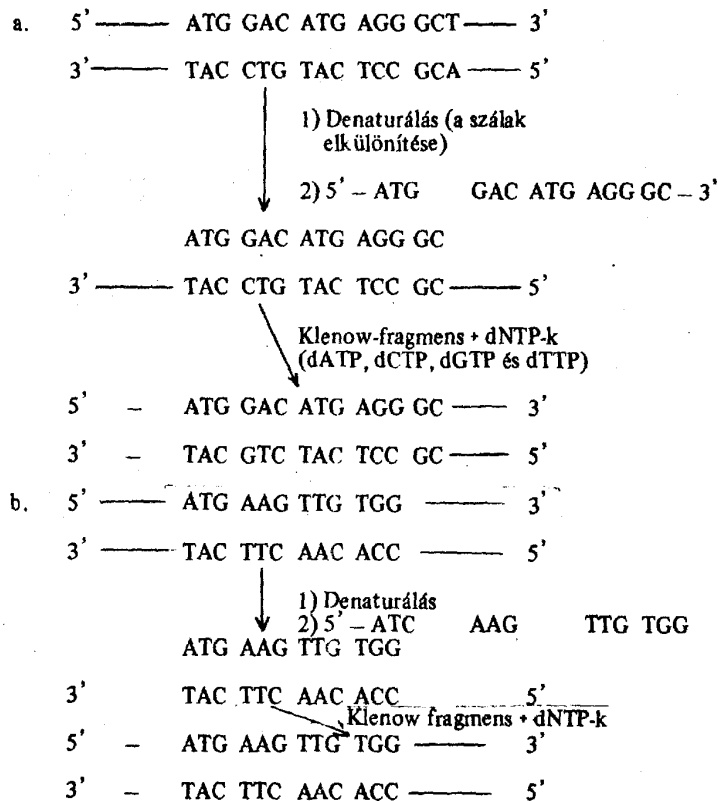
A DNS-szekvencia és a restrikciós térkép alapján megállapítható, hogy PstI helyek találhatóak a kódoló szál -110. bázispárja mellett és a könnyű láncot meghatározó cDNS terminációs helyétől lefelé haladva, ugyanakkor felhasználható HindIII restrikciós helyek helyezkednek el a nehéz láncot meghatározó szál vezető szekvenciájától felfelé és terminációs kodontól lefelé haladva. A könnyű és nehéz lánc változó régióit meghatározó kódoló szál és a vezető szekvenciák nem tartalmaznak a fenti endonukleázok által felismerhető helyet.

Az izolált plazmid dezoxi-ribonukleinsavakat a gyártó utasításai szerint a megfelelő restrikciós endonukleázokkal emésztjük és a kapott fragmenseket 2%-os agaróz gélen (Seakem, 15 cm x 15 cm x 0,2 cm) 100 V feszültségkülönbséggel 2 órán át elektroforézissel tisztítjuk. Kontrollokat használva megállapítjuk az egyes csíkok molekulásúlyát és kivágjuk a gélből. A gélcsíkokat 1,5 ml-es Eppendorf-csővekbe helyezzük, gyorsan fagyaszthatjuk száraz jég-alkoholos fürdőben, majd kétszer felolvasztjuk. Ezután percenként 15000-et forduló Eppendorf centrifugában centrifugáljuk és a felülúszót elkülönítjük. A DNS denaturálására 6xSSC-ben forraljuk a felülúszót, amikor egyszálú DNS-t kapunk. Ezt 0 °C-ra hűtjük.

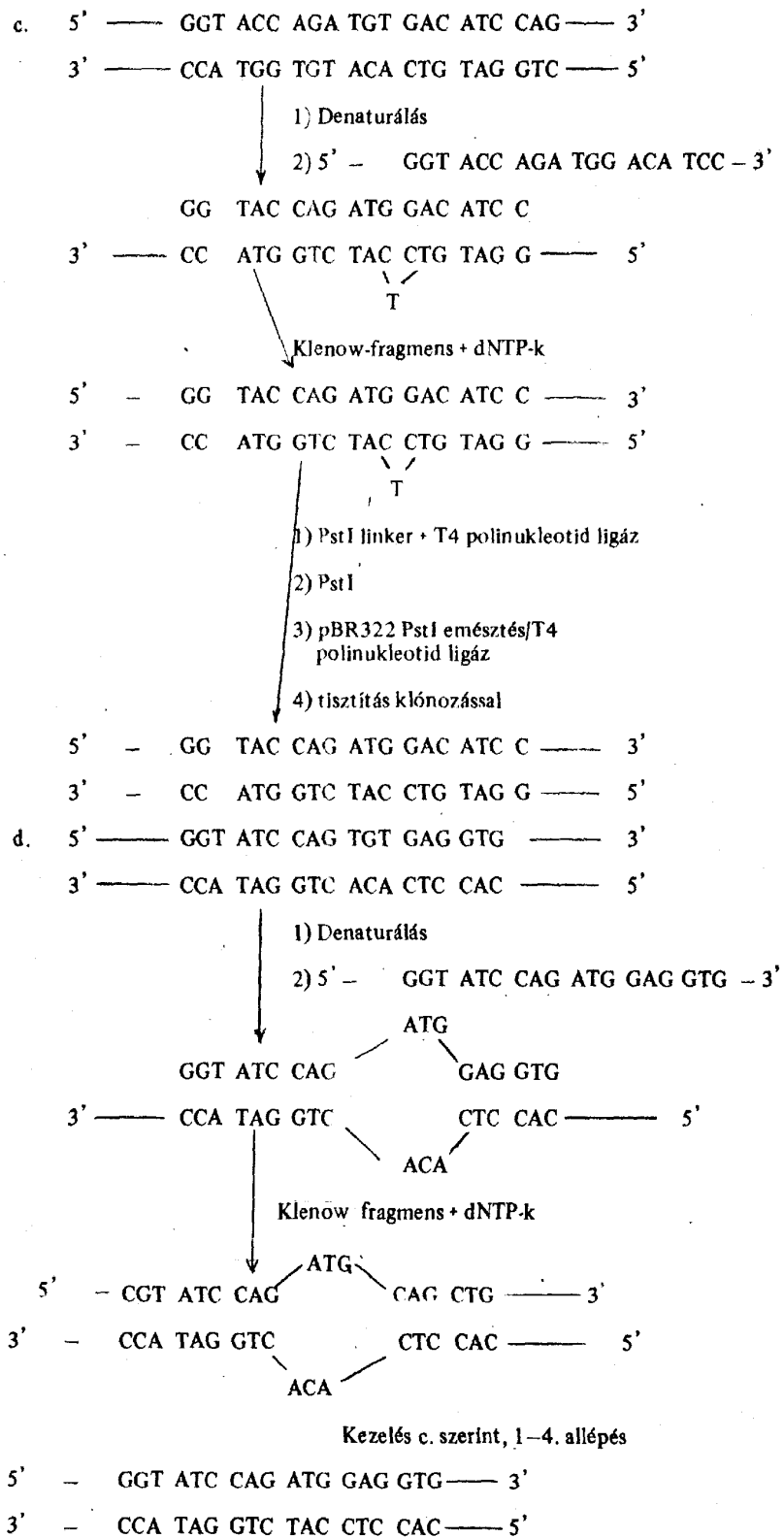
A DNS-szekvencia alapján olyan DNS-oligomert készítünk, amely legalább részben komplementer a könnyű és nehéz lánc változó szakaszának megfelelő nem kódoló (antisense) száljainak rövid szakaszaival. Az oligomer az 5'-végen iniciációs kodont tartalmaz (ATC, az N-formil-metioninhoz (f-met)) továbbá komplementer a primer repair vezető szekvenciáját meghatározó N-terminális nukleotidjaival, vagy olyan végekkel rendelkezik, amelyek f-met kodont tartalmaznak és komplementer szekvenciákat a vezető szakasz kódoló szekvenciájának 3'-végére és a változó régiók kódoló szekvenciájának 5'-végére in vitro mutagenézis végrehajtása céljából. Az oligomert könnyen előállíthatjuk Itakura és munkatársai módszerével (J. Biol. Chem., 150, 4592, 1975).

Az alábbiakban ismertetjük a könnyű és nehéz láncokra alkalmazható primer repair szintézis skémáját, ahol a vezető szekvenciát megtartjuk a, illetve b. és azt az in vitro mutagenézis módszert, amelynek során a vezető szekvenciát eltávolítjuk és a könnyű és nehéz lánc változó szakaszát leíró kódoló szekvencia N-terminális végébe f-met kodont építünk be (a, illetve d). A hosszú vonalak hosszú DNS láncokat, a rövid gondolatjelek a beépített végeket jelentik.

25



196.842



0,5 µg egyszálú DNS-hez 15 pMól 5'-foszforilezett, fentebb az a-nál és b-nél leírt oligonukleotidot adunk 38 µl 200 mM nátrium-kloridot, 13 mM trisz-hidrogén-kloridot (pH 7,5) 9 mM magnézium-acetátot és 20 mM β-merkaptó-etanol tartalmazó elegyben, majd 3 percen át forraljuk és azonnal lehűtjük. A reakcióelegyhez 1 µl, 4–4 mM koncentrációban a négy dezoxi-nukleotid-trifoszfátot, 0,1 µl, 100 mM adenzin-trifoszfátot és 1 µl (1 egység) DNS polimeráz I Klenow-fragmenst tartalmazó oldatot (Boehringer Mannheim) adunk.

Igy az 5'-vezető szekvenciát meghatározó szálakat és a kódoló szekvenciát vagy éppen a változó régió kódoló szekvenciáját szintetizáljuk, és ugyanakkor a 3'-5'-exonukleáz aktivitással leemészítjük a templát nem kódoló szálának 3'-irányában az egyszálú DNS-szekvenciát. A szintézis eredményeképpen a vezető szekvenciát tartalmazó szára olyan homoduplexet kapunk, amely kódolja a vezető szekvenciát és a könnyű és nehéz láncok változó szakaszait. A termék tompa végű, továbbá a kódoló szál 5'-végénél egy iniciációs kodont tartalmaz leolvasási fázisban a további DNS szekvenciával.

A láncok változó régióit és a vezető szekvenciát meghatározó tompa végű duplexhez megfelelő foszforilezett linkereket, például PstI linkereket használva restrikciós linkereket ligálunk T4 polinukleotid ligázt és a gyártó által javasolt reakciókörülményeket használva. A pBR322 vektort PstI enzimmal hasítjuk, amikor kohézív végeket kapunk, ezekkel pedig a módosított cDNS-hez kapcsoljuk.

Mindegyik cDNS-t hozzákapcsoljuk a komplementer végekkel rendelkező lineáris pBR322-höz. A reakcióelegyként használt pufferban (Steinmetz és munkatársai, Cell, 24, 125-134, 1981) azonos moláris mennyiségű vektort és cDNS-t reagáltatunk és az összekapcsolt DNS-t közvetlenül használjuk fel transzformáláshoz.

Az E. coli HB101 (Boyer és Roulland-Dussiox, J. Mol. Biol., 41, 459-472, 1969) törzset egy éjszakán át növesztjük L-táptalajban, míg a tenyészet milliliterként 2×10^8 sejtet tartalmaz. A sejteket centrifugálással összegyűjtjük (Sorval SS34 rotor, 80 000 ford/perc, 4 °C, 5 perc) és 0,5 térfogat 10 mM-os hideg kalcium-kloriddal mossuk. Az üledéket 0,5 térfogat hideg, 30 mM-os kalcium-kloridban szuszpendáljuk. 20 percen át jégfürdőben tartjuk a sejteket, majd ismét centrifugáljuk és 0,1 térfogat 30 mM hideg kalcium-kloridban szuszpendáljuk. Ezután 0,20 ml szuszpenziót adunk 0,1 ml, az elkészített plazmidot tartalmazó 30 mM-os kalcium-klorid oldathoz és 16 percen át jégfürdőben inkubálunk. Ezután mindegyik transzformációs elegyet 75 másodpercen át 42 °C hőmérsékleten tartjuk, majd 5 ml L-táptalajt adagolunk.

A transzformált tenyészeteket 2 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Ezután M-9 szilárd halmazállapotú minimal táptalajon 10 µg/ml tetraciklin jelenlétében növesztjük a transzformánsokat. Az agaron növekvő telepeket 40 µg/ml ampicillint tartalmazó agaros minimal táptalara replikázzuk. Az ampicillinre érzékeny és a tetraciklinre rezisztens sejteket a megfelelő cDNS-t tartalmazó plazmid jelenlétére vizsgáljuk.

A kiválasztott klónokat 18 órán át 2 ml megfelelő táptalajon növesztjük. 0,5 µl alikvót mintát 1,5 ml-es Eppendorf csöbe juttatunk a plazmid extrahálására. A

kísérleteket szobahőmérsékleten végezzük, kivéve, ha másként nem adjuk meg. A centrifugácsiöveket 15 percen át centrifugáljuk, a felülúszót finoman elkülönítjük és a sejteket 100 µl, 2 mg/ml lizozimot, 50 mM glükózt, 10 mM EDTA-t és 25 mM trisz-hidrogén-kloridot (pH 8,0) tartalmazó lizozim oldatban erőteljesen szuszpendáljuk.

30 percen át 0 °C hőmérsékleten inkubálunk, majd 200 µl alkalikus SDS oldatot (0,2 N nátrium-hidroxid és 1% nátrium-dodecil-szulfát) adagolunk, és ezután enyhén vortexeljük a szuszpenziót. 5 percen át 0 °C hőmérsékleten tartjuk a csöveket, majd 150 µl 3 M-os nátrium-acetát oldatot (pH 4,8) adagolunk. Néhány másodpercen át a csövek forgatásával enyhén keverjük az oldatot, majd 16 percen át 0 °C hőmérsékleten tartjuk. 5 percen át centrifugáljuk az elegyet, majd 0,4 ml felülúszót elkülönítünk, egy másik centrifugácsiöbe juttatjuk, 1 ml hideg etanol adunk hozzá és 30 percen át -20 °C hőmérsékleten tartjuk. A csapadékot centrifugálással összegyűjtjük (2 percnyi centrifugálás) és a felülúszót leszívjuk. Az üledéket 100 µl 0,1 M nátrium-acetátban szuszpendáljuk, 200 µl etanol adagolunk és 10 percen át -20 °C hőmérsékleten tartjuk. Ezután centrifugálással ismét összegyűjtjük a csapadékot és 50 µl vízben oldjuk.

Az in vitro mutagenézishez lényegében a fenti eljárást használjuk. A primer repair szintézissel csak egy homoduplexet készítünk, az in vitro mutagenéziskor eredetileg egy heteroduplexet alakítunk ki, ami transzformációt és klónozást követően két heteroduplexet alakít ki: az eredeti génszekvenciát és a módosított vagy hasított génszekvenciát. Az utóbbiban a változás az oligomerben meghatározott szekvenciában is bekövetkezik.

Ahogy azt a c. és d. rekióvázzlat során megadtuk, olyan oligomert állítunk elő, amely a változó régiókat meghatározó kódoló szekvencia N-terminális végén f-metiont meghatározó ATG iniciációs kodont tartalmaz.

A kapott plazmid DNS-t a fentiek szerint eljárva izoláljuk és ismét transzformációt végzünk. A transzformánsokat 2 ml tenyészetben növesztjük a plazmid izolálására. A második klónozásból származó egyetlen transzformáns telepből izolált DNS-t nitrocellulóz szűrőn szűrő hibridizációs módszerrel vizsgáljuk (Wallace és munkatársai, Nucleic Acids Research, 6, 3542-3556, 1979) a próbát P^{32} -radioizotóppal jelzett oligomerral végezzük, amit a mutagenézishez használtunk. Így biztos, hogy a megfelelő hasított cDNS homoduplexet izoláljuk. A hasított szekvenciát tartalmazó klónokat izoláljuk és a kódoló szál 3'-végének további kezelésére izoláljuk a plazmid DNS-t.

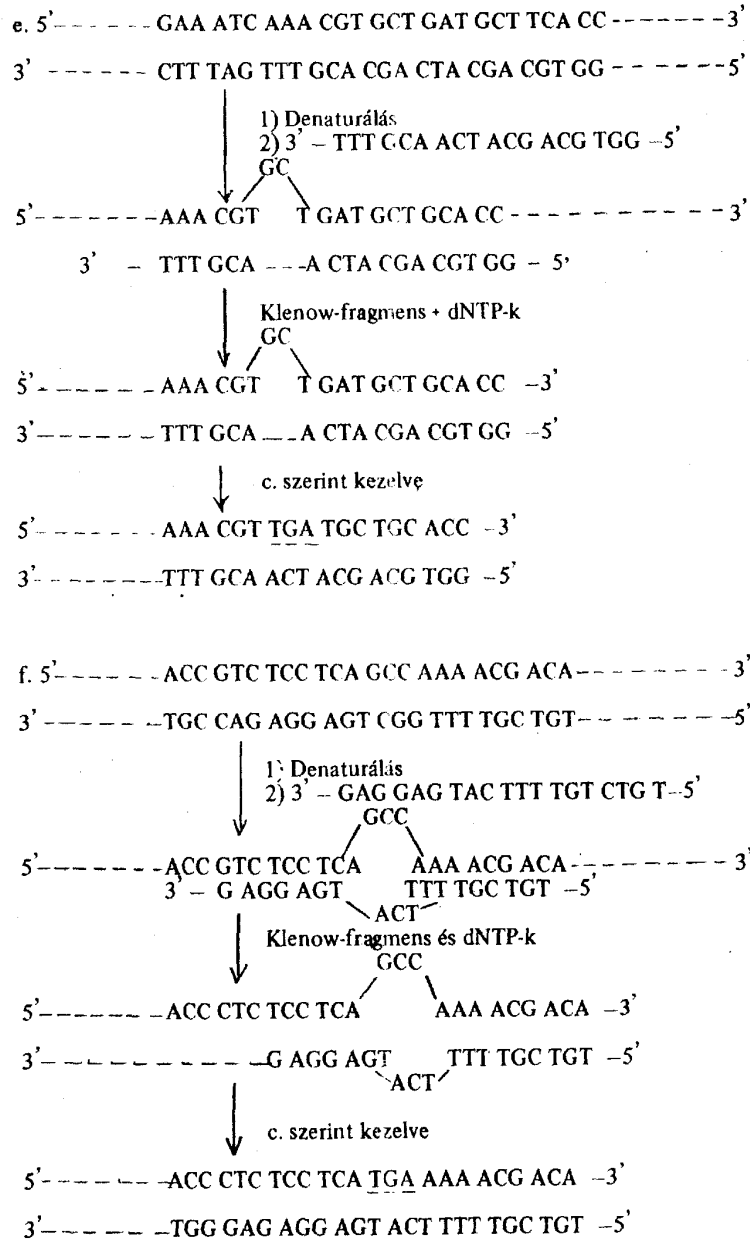
A változó szakaszokat meghatározó cDNS PstI enzimes kezeléssel kihatatható. Az előzőekben ismertett in vitro mutagenézis megismétlésével, ahol egy ATG (start) kodont juttatunk be a kész polipeptid N-terminális aminosavat leíró kodon elé, egy stop kodont juttatunk be a változó régiók C-terminális végéhez. Az előzőekben megadottak szerint eljárva oligonukleotidokat állítunk elő, amelyek komplementer szekvenciával rendelkeznek a cDNS változó régióit leíró kódoló (sense) száljával.

Az alábbiakban megadjuk az oligonukleotidokat és a stop kodon beépítési skémáját a változó szakaszok végéhez. Az e. pontban ismertetjük a stop kodon beépítését a könnyű láncba, míg a stop kodon be-

196.847

juttatását a nehéz láncba az f. pontban adjuk meg. A
szkémában a stop kodont (TGA) aláhúzzuk.

5



A Klenow-fragmens és a négy dezoxi-nukleotid-tri-
foszfát hatására a kódoló szál 3'-vége az oligomerrel
nem komplementer első nukleotiddal együtt lehasad
és az oligomer 3'-vége a kódoló szál 5'-végének irányá-
ban komplementer kiegészítődik. Így a konstans régi-
ót meghatározó szekvencia, az oligonukleotiddal
komplementer néhány nukleotidot kivéve lehasad, de

55

az ellenkező irányban kétszálú DNS épül fel.

A könnyű és nehéz lánc változó szakaszának hasí-
tott szekvenciáját tartalmazó heteroduplexeket ezu-
tán PstI linkerekhez kötjük, PstI endonukleázzal ha-
sítjuk és beépítjük a pBR322 PstI helyére. Klónozást
és újraklónozást követően a változó régió végén stop
kodont tartalmazó hasított kétszálú c)DNS-t tartalma-

60

zó plazmidokat izoláljuk és a változó régiókat meghatározó szekvenciákat (amelyek a vezető szekvenciákat is tartalmazhatják) PstI restrikciós endonukleázal k. hasítjuk a pBR322 plazmidból és felhasználjuk az rFv polipeptid láncok kifejezésére.

A változó régiók kifejezésére a pGMI (pVH253 Δ trpLE1413, Miozari és Yanofsky, J. Bact., 133, 1457-1466, 1978) plazmidot használjuk. A plazmidot módosítjuk úgy, hogy PstI helyet juttatunk be, így lehetőségünk lesz az f-met-kodonnal (ATG) együtt változó régiókat meghatározó szekvenciák beépítésére, mégpedig a Shine-Dalgarno szekvenciához képest megfelelő pozícióban. Az alábbi oligonukleotid szekvenciát állítjuk elő:

AGCTGCAGCTTTCGTT

10 μ g pGMI DNS-t egyik szálán EcoRI endonukleázal (Boehringer Mannheim, 1000 egység) hasítunk 1 ml 100 mM trisz-hidrogén-kloridot (pH 7,2), 50 mM nátrium-kloridot, 3 mM magnézium-acetátot, 0,01% NP-40-et és 150 μ g/ml etidium-bromidot tartalmazó reakcióelegyben, 1 órán át 37 °C hőmérsékleten. 10 mM EDTA (véggkoncentráció) adagolása után 3x10 ml vízzel telített izobutanollal, majd 1 alkalommal fenol és kloroform 1:1 arányú elegyével, kétszer éterrel, végül egyszer izobutanollal extraháljuk az elegyet a térfogat 0,1 ml-re csökkentése érdekében. 0,5 ml térfogatú Sephadex G-25 oszlopon át centrifugálva sómentesítjük az oldatot, majd etanollal kicsapjuk a DNS-t. 5 μ g hasított DNS-t 40 egység exonukleáz III-mal (BRL) inkubálunk 20 μ l, 10 mM trisz-hidrogén-kloridot, pH 7,5, 2 mM magnézium-kloridot, és 1 mM β -merkaptó-etanolt tartalmazó reakcióelegyben. Az inkubálást 37 °C hőmérsékleten 90 percen át végezzük. Adagolással 15 mM trisz-hidrogén-klorid, pH 7,5, 7 mM nátrium-klorid, 7 mM magnézium-klorid és 7 mM dithio-treitol koncentrációt állítunk be. 20 egység bakterialis alkalikus foszfatázt (BBL) és 5 egység Hinfl-et (BRL) adagolunk, majd 30 percen át emésztünk, 37 °C hőmérsékleten. Adagolással 10 mM EDTA koncentrációt állítunk be, kétszer fenol és kloroform 1:1 arányú elegyével extraháljuk, az extraktot éterrel megismételjük és 0,5 ml vízzel kiegyenlített Sephadex G-25 gyantával, centrifugálás közben sómentesítjük az elegyet.

Az így előállított köralakú egyszálú DNS nagy részét 50 pM mennyiségű, az előzőekben megadott 5'-foszforilezett oligonukleotiddal keverjük a PstI hely bejuttatására. A reakciót 38 μ l, 200 mM nátrium-kloridot, 13 mM trisz-hidrogén kloridot, pH 7,5, 9 mM magnézium-acetátot és 20 mM β -merkaptó-etanolt tartalmazó reakcióelegyben végezzük. A reakcióelegyet 30 percen át forraljuk, majd azonnal 0 °C-ra hűtjük. Ezután az alábbi összetételű elegyet adagoljuk: összesen 4 μ l a 4 mM-os négy dNTP-ből, 0,5 μ l 100 mM-os ATP, 3 μ l (3 egység) DNS-polimeráz (Klenow-fragmens) és 4 μ l (10 egység) T4 DNS-ligáz. Egy éjszakán át 12 °C hőmérsékleten inkubáljuk az E. coli HB101 sejtek transzformálására. A transzformánsokat tenyésztjük, izoláljuk és folt-hibridizációs módszerrel, izotóppal jelzett P³²-oligomert használva analizáljuk az új PstI helyet tartalmazó hasított szekvenciát hordozó klónok kimutatására.

A hasított pGMI-et izoláljuk és PstI endonukleázal részlegesen emésztjük és a fentiekben megadottak szerint előállított, a könnyű és nehéz láncok változó régióit meghatározó DNS-szekvenciákat egyenként, a

fentiekben megadottak szerint eljárva beépítjük a hasított helyre, amikor két olyan plazmidot kapunk, amelyek könnyű (pGMIL), illetve nehéz (pGMIL) láncot kódoló DNS-szekvenciákat tartalmaznak. A kapott plazmidokkal E. coli HB101 sejteket transzformálunk, és a könnyű és nehéz láncok változó szakaszait leíró szekvenciákat megfelelő orientációban tartalmazó klónokat restrikciós térképezéssel azonosítjuk és tisztítjuk.

A könnyű és nehéz láncot felismerő antiszérumot az adott lánc antigénként való felhasználásával állítjuk elő, az antiszérumot izoláljuk és ismert módon kovallens kapcsoljuk egy Sepharose gyantához (March és munkatársai, Anal. Biochem., 60, 149-152, 1972), a terméket affinitás kromatográfiához használjuk fel.

A transzformánsokat milliliterenként 10⁷ sejtet tartalmazó sejtsűrűségű tenyésztjük, majd centrifugálással összegyűjtjük. Az üledéket 50 μ l, alábbi összetételű elegyben szuszpendáljuk: 50 mM trisz-hidrogén-klorid, pH 8,0, 50 mM EDTA, 15% szacharóz, 1 mg/ml lizozim, 0,5% NP40. 30 percen át 0 °C hőmérsékleten tartjuk a szuszpenziót, majd 10 μ l 150 mM-os trisz-hidrogén-kloridot, pH 7,5, 280 mM magnézium-kloridot, 4 mM kalcium-kloridot és 1 μ g DNáz-t adagolunk hozzá, és ezt követően 15 percen át 12 000 g-n centrifugáljuk.

A felülúszót az üledékről leszívjuk és izoláljuk a fehérjét. A felülúszót trisz-hidrogén-klorid, pH 7,5, oldattal kiegyenlített, 0,15 ml térfogatú immunszorbens oszlopon engedjük át. Az rFv könnyű és nehéz láncait 2,5 pH-jú mólos ecetsavval eluáljuk, az eluátumokat összegyűjtjük és 0,1 M nátrium-hidroxid oldattal 0 °C hőmérsékleten pH 5,5-re semlegesítjük. 3x100 térfogat nátrium-acetát pufferral, pH 5,5, szemben dializáljuk az eluátumot, majd a dialízist 3x100 térfogat pH 7-es PBS-sel szemben megismételjük.

Ha a renaturált könnyű és nehéz rFV láncok azonos forrásból származnak, úgy atokat tovább tisztíthatjuk az rFV komponenseket tartalmazó eluátumok egyesítésével és DNP-affinitás kromatográfiával. (A megadott példában kapott nehéz és könnyű láncok különböző forrásból származnak, így ezt a lépést nem kell elvégeznünk). A DNP-affinitás oszlopot és az eljárást Kooistra és Richard írja le. (Biochem., 17, 345-351, 1978). A kötött rFV-t 1 mólos ecetsavval eluáljuk, majd a fentiek szerint végzett egymást követő dialízisekkel renaturáljuk. Azonkívül a szulfhidrilcsoportok megőrzésére jó-d-acetammal kezelünk Kooistra és Richards (1. fent) szerint eljárva.

A találmány szerinti eljárással olyan protein komplexekből álló homogén készítményt állítunk elő, amely előre meghatározott heptan hellyel erős kötőképességgel rendelkező, két peptid láncból álló komplexet képez. A két lánc egy rFv-t alkot, amely specifikusan kapcsolódik egy adott ligandhoz, mivel a természetben előforduló immunglobulint utánoz. A konstans régiók nélkül az előállított rFv csökkent immungencitással rendelkezik, és nem tartalmaz adott felhasználási területen, például a komplement fixáláskor előnytelen funkciókkal rendelkező peptid szekvenciákat.

A találmány szerinti rFv célra, diagnózisra és terápiás célokra használható fel. A készítmény homogén és ezért mindig reprodukálható immunogenetikus értékkel rendelkezik. A termék csökkent molekulásúlya

miatt, emlős szervezetbe injektálva, rövid ideig marad a testben. Ez különösen akkor fontos, ha az rFv veszélyes jelzéssel, például radioizotóppal, nehéz fém-mel, citotoxikus szerrel és hasonlókkal ellátva kerül diagnózis vagy terápiás okokból a szervezetbe. A rövid tartózkodási idő előnyös abban az esetben is, ha az rFv-vel in vivo élettani szempontból aktív anyagokat, például hormonokat, enzimeket, felületi receptorokat, limfocitákat vagy más sejteket vagy hasonlókat gátolunk.

Az egységes készítmény szabályozott jelzést tesz lehetővé, növeli a konjugátum képességét egy adott hely jelzésére az egyik vagy másik, vagy mindkét láncban. A homogenitás szabályozott konjugációt tesz lehetővé, pontosan meghatározhatjuk a terápiás aktivitást, könnyen megfigyelhetjük a terápiás hatást, növelhető az eredmények reprodukálhatósága és szabályozhatjuk, illetve könnyen megfigyelhetjük a mellékhatásokat.

A találmány szerinti eljárással olyan polipeptid láncok pontos szintézise végezhető el, amelyek összekapcsolva egy előre meghatározott epitopikus helyre néző kötő pontot tartalmaznak. Az eljárással előállított könnyű és nehéz láncok a ligand jelenlétében vagy anélkül kapcsolhatók össze. A találmány szerinti eljárással lehetőségünk nyílik egy adott célra felhasználni, például radiojódozásra használt tirozin esetén, egy lánc bármelyik végére egy adott aminosav beépítésére. A változó régiókat meghatározó DNS forrásként monoklonozott hibridomákat használva a természetes kötőképesség megmarad és a kötő-affinitás széles határok között változtatható.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás egy előre meghatározott ligandra specifikus immunoglobulin könnyű vagy nehéz láncának változó szakaszát meghatározó kétszálú, az 5'-végen iniciációs és a 3'-végen terminációs kodont hordozó dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciát tartalmazó – mely szekvencia az adott változó szakaszon kívüleső aminosav-csoportokat meghatározó nukleotidoktól mentes – transzformáló kifejeződő vektor előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy

egy, a fenti láncot meghatározó mRNS-ből az adott könnyű vagy nehéz lánc legalább egyikét kódoló kétszálú cDNS-t állítunk elő,

a kapott kétszálú cDNS-ről eltávolítjuk a változó szakaszon kívüleső nukleotid-szekvenciákat, és a változó szakaszt kódoló hasított kétszálú cDNS előállítására az 5'-véget iniciációs, a 3'-véget terminációs kodonnal látjuk el, és a

a kapott kialakított kétszálú cDNS-t ennek kifejezésére egy kifejeződő vektorba építjük be.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az iniciációs és terminációs kodonokat in vitro mutagenézissel építjük be.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a beépítés előtt a kétszálú cDNS legalább egy nukleotidját egy, az eredetiből különböző aminosavat meghatározó kodon kialakítására kicseréljük.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy

a) kétszálú, egy immunoglobulin könnyű vagy egy

nehéz láncát meghatározó cDNS-t állítunk elő, ahol mindegyik lánc egy állandó és egy változó szakaszból áll, és ahol a változó szakasz mintegy 95–125 aminosavat tartalmaz, oly módon, hogy az adott láncot kódoló mRNS-t izoláljuk, egyszálú cDNS előállítására reverz transzkriptázzal kezeljük az mRNS-t, DNS polimerázzal az egyszálú cDNS-re komplementer szálát szintetizálunk, amikor a könnyű vagy nehéz láncot meghatározó, kódoló szállal rendelkező kétszálú cDNS-t kapunk, amelyben a kódoló szál 5'-3'-irányban az immunoglobulin vezető szekvenciáját, a változó és az állandó régiókat meghatározó DNS-szekvenciákat tartalmaz, majd a kétszálú cDNS-t klónozzuk,

b) a klónozott kétszálú cDNS-ből egy kódoló vagy nem kódoló egyszálú cDNS-t állítunk elő, majd ezután deaf vagy cdf sorrendben elvégezzük a c., d., e. és f. lépéseket,

c) a vezető és a változó szakaszt meghatározó kódoló szekvencia végpontjára eső nem kódoló szállhoz egy iniciációs helyet meghatározó iniciációs kodont tartalmazó első oligonukleotid primert hibridizálunk, majd az így kapott első duplexet enzimatikusan kezeljük az első oligonukleotid primer a nem kódoló egyszálú cDNS-re 5'-3'-irányban komplementer meghosszabbítására és ezután N-terminálisan meghatározott és kialakított kétszálú cDNS előállítására a kódoló egyszálú cDNS-t az első oligonukleotid primerre komplementer szekvenciáig a másik irányban leemésztjük,

d) a változó és az állandó szakasz végpontját meghatározó DNS-szekvenciához a kódoló szállra egy második, stop anti-kodont tartalmazó oligonukleotid primert hibridizálunk, majd az így kapott második duplex molekulát enzimatikusan kezeljük a második oligonukleotid primer 5'-3'-irányban az adott kódoló szállra komplementer meghosszabbítására és végül C-terminálisan meghatározott és kialakított kétszálú cDNS előállítására az adott kódoló egyszálú cDNS-t a második oligonukleotid primerre komplementer szekvenciáig a másik irányban leemésztjük,

e) az így kapott C- vagy N-terminálisan meghatározott és kialakított kétszálú cDNS-t klónozzuk, a C- vagy N-terminálisan meghatározott és kialakított így kapott kétszálú cDNS-t kódoló és nem kódoló szállakra választjuk szét és felhasználjuk a kódoló szállat, ha a d. lépés következik, illetve a nem kódoló szállat, ha a c. lépést végezzük el, végül

f) az előállított N- és C-terminálisan meghatározott és kialakított kétszálú cDNS-t klónozzuk, ezután az N- és C-terminálisan meghatározott és kialakított kétszálú, az adott kódoló szekvenciát tartalmazó cDNS-t a transzkripció és a transláció szabályozó jelekkel megfelelő orientációban egy kifejeződő vektorba építjük be.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy

a) egy immunoglobulin könnyű vagy nehéz láncát meghatározó kétszálú cDNS előállítására, ahol a láncok mindegyike egy állandó és egy változó régióból áll, és ahol a változó régiók mintegy 95–125 aminosavból állnak,

izoláljuk az adott láncot meghatározó mRNS-t, egyszálú cDNS előállítására az mRNS-t reverz transzkriptázzal kezeljük, kétszálú cDNS előállítására DNS polimerázzal kezeljük az egyszálú cDNS-t, amikor a szállra komplementer szál szintetizálódik és amikor

olyan kétszálú cDNS-t kapunk, amelynek kódoló szála az adott könnyű vagy nehéz láncot határozza meg, és ahol a kódoló szál 5'-3'-irányban az adott immunoglobulin vezető szekvenciáját, változó szakaszát és konstans régióját meghatározó DNS-szekvenciát tartalmaz, majd az így kapott kétszálú cDNS-t klónozzuk,

b) az adott könnyű vagy nehéz lánc változó szakaszán túleső régiókat meghatározó DNS legalább egy részét a klónozott kétszálú cDNS-t kódoló és nem kódoló száakra szétválasztva eltávolítjuk,

a nem kódoló szállhoz egy első duplex előállítására egy változó régió kifejezését meghatározó iniciációs helyet leíró iniciációs kodont hordozó első oligonukleotid primert hibridizálunk, amely első oligonukleotid primer komplementer a vezető szakasz N-terminális részét meghatározó szekvenciára vagy részlegesen komplementer a vezető szakasz és változó régió kapcsolódási pontját meghatározó DNS-szekvenciára, és amely a kapcsolódási pontnál egy nem komplementer iniciációs kodont tartalmaz, az így kapott első duplexet az első oligonukleotid primer 5'-3'-irányban a nem kódoló egyszálú cDNS-re komplementer meghosszabbítására enzimmel kezeljük és a nem kódoló egyszálú cDNS-t N-terminálisan meghatározott kétszálú cDNS előállítására az első oligonukleotid primerre komplementer szekvenciáig leemésztjük,

a kapott N-terminálisan meghatározott és kialakított kétszálú cDNS-t klónozzuk,

a kapott N-terminálisan meghatározott és kialakított kétszálú cDNS-t kódoló és nem kódoló száakra választjuk szét,

a kódoló szállhoz egy második duplex előállítására egy stop anti-kodont tartalmazó, de egyébként az adott változó és adott állandó régió kapcsolódási pontján lévő szekvenciára komplementer második oligonukleotidot hibridizálunk, ahol a stop anti-kodon a kapcsolódási helyen van és így az adott változó régió terminális végére egy stop kodon kerül, az így kapott duplexet a második oligonukleotid primer a kódoló szárra komplementer 5'-3'-irányú meghosszabbítására enzimmel kezeljük, majd a második oligonukleotid primerre komplementer szekvenciáig a másik irányban leemésztjük a kódoló egyszálú cDNS-t, amikor az adott immunoglobulin konstans régióját nem leíró, a változó régió könnyű vagy nehéz láncát kódoló N- és C-terminálisan meghatározott és kialakított kétszálú cDNS-t kapunk,

a kapott N- és C-terminálisan meghatározott és kialakított kétszálú cDNS-t klónozzuk, és

az N- és C-terminálisan meghatározott és kialakított kétszálú cDNS-t az adott kódoló szekvencia szempontjából a transzkripció és transláció szabályozó jelekkel megfelelő kapcsolatba tartva kifejeződő vektorba vagy plazmidba építjük be.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az első oligonukleotid primert úgy hibridizáljuk, hogy homoduplexet alkosson az adott nem kódoló szállal az adott vezető szekvencia N-terminális végén.

7. A 4. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az első oligonukleotid primert az adott változó régiót meghatározó DNS-szekvencia N-terminális végére egy iniciációs kodont bejuttatva az adott vezető-szekvencia és az adott változó-szekvencia kapcsolódási helyére hibridizáljuk.

8. A 4., 6. és 7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a beépítés előtt az N- és C-terminálisan meghatározott és kialakított kétszálú cDNS-be egy egyedülálló restriktió linkert ligálunk és ezúton kohézív végek előállítására a linkert enzimatikusan hasítjuk.

9. A 4., 6. és 7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a c) vagy d) lépés legalább egyikében olyan oligonukleotid primerrel hibridizálunk, mely csak részlegesen komplementer az adott cDNS-szárra.

10. A 4-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a hibridizációs lépéseket követő klónozás során az adott első vagy második oligonukleotid-szekvenciát hordozó klónokat szelektáljuk, az adott kétszálú cDNS-t tartalmazó DNS-t izoláljuk és újra klónozzuk az adott kétszálú cDNS-t.

11. Eljárás egy előre meghatározott ligandra specifikus immunoglobulin könnyű vagy nehéz lánc változó régiójának legalább egy részét adó aminosav-szekvenciából álló kötő polipeptid előállítására, ahol az aminosav-szekvencia az analóg lánc kötőspecifitásával rendelkezik, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy

az adott láncot meghatározó mRNS-ből a könnyű vagy nehéz láncok legalább egyikét kódoló kétszálú cDNS-t állítunk elő,

a kétszálú cDNS-ről lehasítjuk az adott változó régiókon kívüleső részt leíró nukleotid-szekvenciát, és a változó régiót kódoló meghatározott kétszálú cDNS előállítására a DNS-szekvencia 5'-végebe iniciációs és 3'-végebe terminációs kodont építünk be,

a kétszálú cDNS kifejezésére kifejeződő vektorba építjük be a kialakított kétszálú cDNS-t és az adott, kialakított kétszálú cDNS-t tartalmazó kifejeződő vektorral egy erre alkalmas gazdasejtet transzformálunk,

a transzformált gazdasejtet növesztjük, amikor az adott könnyű és nehéz láncok egyikének kötő polipeptidje kifejeződik, és

izoláljuk az adott kötő polipeptidet.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy gazdasejtként baktériumot használunk.

13. A 11. vagy 12. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az immunoglobulinként IgG-t állítunk elő.

14. A 11-13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a nehéz lánc változó régiójaként D-szekvenciát tartalmazó régiót állítunk elő.

15. Eljárás egy előre meghatározott ligandra specifikus immunoglobulint könnyű vagy nehéz láncának változó szakaszát meghatározó kétszálú, az 5'-végen iniciációs és 3'-végen terminációs kodont hordozó dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciát tartalmazó - mely szekvencia az adott változó szakaszon kívüleső aminosav-csoportokat meghatározó nukleotidoktól mentes - transzformáló kifejező vektorral transzformált gazdasejtek előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy

az említett láncot meghatározó mRNS-ből a könnyű vagy nehéz láncok legalább egyikét kódoló kétszálú cDNS-t állítunk elő,

a kétszálú cDNS-ről lehasítjuk az adott változó régiókn kívüleső részt leíró nukleotid-szekvenciát, és a változó régiót kódoló meghatározott kétszálú cDNS

196.842

előállítására a DNS-szekvencia 5'-végébe iniciációs és 3'-végébe terminális kodont építünk be,

a kétszálú cDNS kifejezésére kifejeződő vektorba építjük be a kialakított kétszálú cDNS-t, és

a kifejeződő vektorral egy gazdasejtet transzformálunk.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az iniciációs és terminációs kodonokat mutagenezissel építjük be.

17. A 15. vagy 16. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a beépítés előtt a kétszálú cDNS legalább egy nukleotidját egy, az eredetitől különböző aminosavat meghatározó kodon kialakítására kicseréljük.

18. A 15–17. igénypontok bármelyike szerinti el-

járás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy gazdasejtként baktériumot használunk.

19. A 18. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy gazdasejtként E. colit használunk.

20. Eljárás egy előre meghatározott ligandra specifikus immunglobulin könnyű vagy nehéz láncának változó szakaszát meghatározó kétszálú, az 5'-végen iniciációs és a 3'-végen terminációs kodont hordozó dezoxi-ribonukleinsav-szekvenciát tartalmazó – mely szekvencia az adott változó szakaszon kivüleső aminosav-csoportokat meghatározó nukleotidoktól mentes – transzformáló kifejeződő vektorral transzformált gazdasejtek előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a gazdasejtet az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított transzformáló kifejeződő vektorral transzformáljuk.

rajz nélkül

Kiadja: Országos Találmányi Hivatal
Felelős kiadó: Himer Zoltán o.v.

KÓDEX
