

## „Core”-glikozilált HCV-burokproteinek

## Kivonat

5

A találmány tárgyát HCV-burokproteinek vagy legalább egy N-glikozilációs helyet tartalmazó fragmenseik képezik, melyek eukarióta sejtekben végzett expresszáltatás termékei. Közelebbről a HCV-burokproteinek N-glikozilációs helyeinek átlagosan legfeljebb 80 %-a „core”-glikozilált. Ezek az N-glikozilációs helyeknek több, mint 70 %-a 8-10 mannózt tartalmazó oligomannózzal van glikozilálva. Ezenkívül a Man(7)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal „core”-glikozilált helyek számának Man(8)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal „core”-glikozilált helyek számához viszonyított aránya legfeljebb 0,45. A „core”-glikozilált helyek 10 %-nál kevesebb láncvégi  $\alpha$ 1,3-mannózt tartalmazó oligomannózzal vannak glikozilálva. A találmány szerinti HCV-burokproteinek különösen alkalmasak diagnosztikai, profilaktikus és terápiás célokra. A találmány szerinti HCV-burokproteinek előállítására alkalmas eukarióta sejt *Hansemula* sejt.

Regl.

**„Core”-glikozilált HCV-burokproteinek**

A találmány tárgyát rekombináns protein-expresszáltatás, hepatitis-C vírus (HCV) okozta fertőzés diagnosztizálása, HCV-fertőzés kezelése és megelőzése, valamint krónikus hepatitisben szenvedő páciens kezelése klinikai hatékonyságának, illetve a betegség természetes lefolyásának prognosztizálása/ellenőrzése. Közelebbről, a találmány tárgyát hepatitis-C vírus burokproteinjének élesztősejtekben történő termeltetése; „core”-glikozilált vírusburok-proteinek termeltetésére alkalmas élesztőtörzsek; valamint a találmány szerinti HCV-burokproteinek diagnosztikai, megelőzési és terápiás célú alkalmazása képezi.

A hepatitis-C vírus okozta fertőzés a fejlett és fejlődő országokban egyaránt az egyik legfőbb egészségügyi probléma. Becslések szerint a világ népességének kb. 1-5 %-a fertőzött e vírussal. A transzfúzióval terjedő hepatitis legjelentősebb okának a HCV-fertőzés bizonyult, amely gyakran krónikus májkárosodáshoz vezet. Ezenfelül, bizonyítékok állnak rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a HCV szerepet játszik a májsejt-karcinóma kialakulásában. Ennek megfelelően, nagy igény van a HCV-fertőzés megbízható diagnosztikai módszereire és a fertőzés elleni hatásos terápiás hatóanyagokra. Ezen túlmenően, szükség van a HCV-vel szennyezett vérkészítmények érzékeny és specifikus szkrínelési eljárásaira, valamint a HCV tenyésztésének javított módszereire.

A HCV egy 9600 bázisos (+)RNS-vírus, amely egyetlen, kb. 3000 aminosavból álló poliprotein-prekurzort kódol. Kimutatták, hogy e prekursor – ko- és poszt-transzlációs módosításokkal kapcsolt – proteolitikus hasítás legalább három strukturális és hat nem strukturális proteint eredményez. A strukturális proteineket – szekvencia-homológia alapján – egy core-proteinként és két vírusburok-glikoproteinként (E1 és E2) határozták meg. Az E1-protein 192 aminosavból áll és – a HCV-genotípustól függően - négy-öt N-glikozilációs helyet tartalmaz, míg az E2-protein 363-370 aminosavból áll és – szintén a HCV-genotípustól függően – 9-11 N-glikozilációs helyet tartalmaz [áttekintést ld. Major és Feinstone (1997); Maertens és Stuyver (1997); a hivatkozások adatait ld. az irodalomjegyzékben. Az E1-protein különböző variábilis doméneket tartalmaz [ld. Maertens és Stuyver (1997)]. Az E2-protein három hipervariábilis domént tartalmaz, melyek közül a fő domén a protein N-terminális végén helyezkedik el [Maertens és Stuyver (1997)]. A HCV-glikoproteinek főként az endoplazmatikus retikulumban (ER) lokalizálódnak, ahol bekövetkezik módosulásuk és oligomer-komplexekké történő összerendeződésük.

Eukarióta sejtekben a cukorgyökök általában négy különböző aminosavhoz kötődnek. Ezek az aminosavak O-kötésűek (szerin, treonin és hidroxilizin), illetve N-kötésűek (aszparagin) lehetnek. Az O-kötött cukrok a Golgi-apparátusban vagy a durva endoplazmatikus retikulumban, nukleotid-cukrokból szintetizálódnak. Az N-kötött cukrok közös prekursor-  
5 ből szintetizálódnak, s érésük ezt követően zajlik le. A HCV-burokproteinek N-glikozilált proteinekként sorolhatók be. Ismeretes, hogy az N-kötött szénhidrát-láncok proteinekhez történő kapcsolása fontos szerepet játszik a hajtogatódási („folding”) köztestermékek stabilizálásában (s ezáltal a glikoproteinek hatékony hajtogatódásában, a hibás „folding” és az endoplazmatikus retikulumon belüli lebomlás megakadályozásában, továbbá a glikoproteinek oligomeri-  
10 zációjában, biológiai aktivitásában és transzportjában [áttekintést ld. Rose és mtsai. (1988); Doms és mtsai. (1993); Helenius (1994)]. Az N-kötött oligoszacharidok konszenzus kötőhelyei a polipeptidekben elhelyezkedő Asn-X-Ser és Asn-X-Thr tripeptid-szekvenciák (melyekben „X” jelentése: tetszőleges aminosav). Az N-kötött oligoszacharid polipeptidhez történő kapcsolódása után az oligoszacharid komplex típusú (amely N-acetil-glükózamint, mannózt,  
15 fukózt, galaktózt és szialsavat) vagy nagy mannóztartalmú típusú alakulhat (amely N-acetil-glükózamint és mannózt tartalmaz). A HCV-burokproteinek a nagy mannóztartalmú típusba sorolják. Élesztőkben az N-kötött oligoszacharidok érési folyamata nagyban eltér az emlősök Golgi-apparátusában lejátszódó éréstől. Élesztőkben az oligoszacharid-láncok meghosszabbítása a Golgi-apparátusban mannóz lépésenkénti hozzákapcsolásával következik be, ami nagy-  
20 számú mannózt tartalmazó, összetett struktúrák kialakulásához vezet (ezt a jelenséget hiperglikozilációnak nevezzük). Ezzel szemben, a prokariótákban expresszálandó proteinek nem glikoziláltak.

Különféle eukarióta sejtek esetében leírták a proteinek vagy peptidek nagy mannóztartalmú típusba tartozó glikozilációs módosításait. Emlőseredetű sejtekben egy "core"-glikozilációs típusú oligoszacharidban két N-acetil-glükózamin gyökhöz átlagosan 5-9 mannózegység kapcsolódik [ez a struktúra röviden a következők szerint írható le: Man(5-9)GlcNAc(2)]. A "core"-glikoziláció Herscovics és Orleans (1993) cikkének 3. ábráján látható, bekeretezett struktúrához hasonló szerkezetet reprezentál.

Ahogy az EP0256421 számú európai szabadalmi leírásban feltárták, a metilotróf  
30 *Pichia pastoris* élesztőben egy glikozilációs helyhez 8-14 mannózegység kapcsolódik [Man(8-14)GlcNAc(2)], és az N-kötött oligoszacharidok 85 %-ának mérete a Man(8-14)GlcNAc(2) tartományba esik [ld. Grinna és Tschopp (1989)]. Más kutatók a *Pichia pastoris*-ban termeltetett heterológ proteinekkel kapcsolatban némileg eltérő oligoszacharid-struktúrákat írtak le:

Man(8-9)GlcNAc(2) [Montesino és mtsai. (1998)]; Man(9-14)GlcNAc(2) vagy Man(9-15)GlcNAc(2) [Kalidas és mtsai. (2001)]; és Man(8-18)GlcNAc(2), ezen belül túlsúlyban a Man(9-12)GlcNAc(2), legáltalánosabb pedig a Man(10)GlcNAc(2) [Miele és mtsai. (1998)]. Trimble és mtsai. (1991) az N-kötött oligoszacharidok 75 %-ában a Man(18)GlcNAc(2) és a Man(9)GlcNAc(2) egyenlő megoszlását találták, míg 17 %-ban az N-glikozilációs helyeket a Man(10)GlcNAc(2), a maradék 8 %-ban pedig a Man(11)GlcNAc(2) foglalja el. Scorer és mtsai. (1993) egy *P. pastoris*-ban termeltetett protein hiperglikozilációjáról számoltak be.

*Aspergillus niger*-ben az N-glikozilációs helyekhez Man(5-10)GlcNAc(2) kapcsolódik [Panchal és Wodzinski (1998)].

A *Saccharomyces cerevisiae* glikoziláció-deficiens mutánsa (*mnn9*) annyiban tér el a vad típusú *Saccharomyces cerevisiae*-től, hogy az *mnn9*-sejtek – a hiperglikozilált proteinek helyett - Man(9-13)GlcNAc(2) szerkezetű módosított oligoszacharidot tartalmazó - glikozilált proteineket termelnek [ld. az 5 135 854 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást (Mackay és mtsai.) és a WO 94/01132 számú nemzetközi közzétételi iratot (Kniskern és mtsai.)]. Leírtak egy másik *Saccharomyces cerevisiae* mutánst is (*och1mnn9*), amely a proteinek N-glikozilációs helyeihez Man(8)GlcNAc(2)-struktúrát kapcsol [JP06277086 (Yoshifumi és mtsai.)].

A *Saccharomyces cerevisiae* (vad típus és *mnn9*-mutáns) "core"-oligoszacharidok jellemző sajátága a terminális  $\alpha$ 1,3-kötésű mannózgyökök jelenléte [Montesino és mtsai. (1998)]. A *P. pastoris* vagy *Saccharomyces cerevisiae och1mnn1* által termelt proteinek N-glikozilációs helyeihez kapcsolódó oligoszacharidok mentesek a terminális  $\alpha$ 1,3-kötésű mannózgyököktől [Gellissen és mtsai. (2000)]. Jenkins és mtsai. (1996) szerint a terminális  $\alpha$ 1,3-kötésű mannózok allergének, így az oligoszacharidjaikon terminális  $\alpha$ 1,3-kötésű mannózgyököket tartalmazó proteinek diagnosztikai és terápiás célokra alkalmatlanok.

A *Hansenula polymorpha* metilotróf élesztő által termelt proteinek glikozilációs mintázatát – annak ellenére, hogy ezt az élesztőfajt számos heterológ protein termeltetésére alkalmazzák [ld. Gellissen és mtsai. (2000) cikkének 3. táblázatát] – még nem tanulmányozták részletesen. A Janowicz és mtsai. (1991), illetve Diminsky és mtsai. (1997) által leírt kísérletek eredményei alapján, úgy tűnik, hogy a *H. polymorpha* a hepatitis-B vírus nagy, illetve kisméretű felületi antigénjét (HbsAg) nem, illetve alig glikozilálja. Ennek legvalószínűbb oka az a tény, hogy a HbsAg szignálpeptid nélkül expresszálódik, miáltal a termelődött HbsAg nem jut be az endoplazmatikus retikulum (ER) lumenébe, így nem glikozilálódik. Fisher és mtsai. (WO

00/40727) arról számoltak be, hogy a *H. polymorpha* által termelt granulocita-kolonizációt stimuláló faktorhoz (G-CSF) a mono- vagy dihexózok korlátozott mennyiségben kapcsolódnak. Ugyanakkor, a *H. polymorpha* sejtekben expresszáltatott heterológ  $\alpha$ -galaktozidáz esetében hiperglikozilációt figyeltek meg [ld. Fellingner és mtsai. (1991)].

5 Jelenleg a betegségek leküzdésének leggazdaságosabb és leghatásosabb módja a betegség elleni vakcinálás. Mindazonáltal, a hatékony HCV-vakcina kifejlesztésére irányuló kísérletek - az ígéretes eredmények ellenére - nem jártak sikerrel. A vakcinákkal szemben elengedhetetlen követelmény, hogy páciensekben immunreakciót legyenek képesek kiváltani. Ennek megfelelően, a HCV antigénhatású determinánsainak azonosítására van szükség, melyeket  
10 pontos séma szerint adagolhatók a pácienseknek. Az antigénhatású determinánsok legalább két alakban léteznek: lineáris és konformációs epitópok. A konformációs epitópok a molekula térbeli hajtogatódásának („folding”) eredményeként (ideértve a ko- és poszt-transzlációs módosításokat, mint pl. a glikozilációt) alakulnak ki. Az általánosan elfogadott nézet szerint a konformációs epitópok reprezentálják a leghatásosabb vakcinákat, mivel ezek a natív HCV-  
15 epitópokra emlékeztetnek, és nagyobb mértékben konzerváltak, mint a lineáris aminosav-szekvencia. Ilyenformán, a natív HCV antigéndeterminánsok létrehozása szempontjából a HCV-burokproteinek végső glikozilációs foka a legnagyobb jelentőségű, azonban a HCV tenyésztésével kapcsolatban látszólag áthidalhatatlan nehézségek merülnek fel, melyek eredményeként csak minimális mennyiségű virion hozható létre. Ezen túlmenően, jelentős problémákat  
20 okoz a rekombináns proteinek expresszáltatása és tisztítása is, miáltal kis mennyiségű protein, hiperglikozilált proteinek, illetve glikozilálatlan proteinek nyerhetők.

A HCV-burokproteineket korábban rekombináns technikák alkalmazásával *Escherichia coli* sejtekben, rovarsejtekben, élesztősejtekben és emlőseredetű sejtekben termeltették, azonban a magasabb rendű eukariótákban végzett expresszáltatással nehezen állítható elő a vakcinához szükséges, nagy mennyiségű antigén. A prokariótákban (pl. *E. coli* sejtekben) történő expresszáltatás glikozilálatlan HCV-burokproteineket eredményez, míg élesztősejtekben hiperglikozilált HCV-burokproteinek termelődnek. Ahogy azt Maertens és mtsai. kimutatták (ld. a WO 96/04385 számú nemzetközi közzétételi iratot), az E2 HCV-burokprotein *Saccharomyces cerevisiae*-ben végzett expresszáltatása nagymértékben glikozilált protei-  
25 neket eredményez. Ez a hiperglikoziláció a protein epitópjainak védelmét eredményezi. Bár Mustilli és mtsai. (1999) szerint a HCV-E2 *Saccharomyces cerevisiae*-ben történő expresszáltatása „core”-glikozilációt eredményez, az intracellulárisan expresszáltatott anyag kísérleti eredményei azt bizonyítják, hogy legalább részben hiperglikozilált, az anyag többi részének  
30

megfelelő érési folyamatát azonban nem mutatták ki. Ezen túlmenően, a Mustilli és mtsai. (1999) által megfigyelt hiperglikoziláció csak tunicamycin (glikoziláció-inhibitor) jelenlétében gátolható, így ez nem tükrözi a normál, természetes szaporodási feltételek mellett bekövetkező hiperglikozilációt. Az intracelluláris forrásból származó HCV-burokproteinekre általános igény mutatkozik [Maertens és mtsai. (WO 96/04385); Heile és mtsai. (2000)]. E szükségletet alátámasztja az is, hogy az élesztőben termeltetett, szekretált E2-protein az emlőseredetű sejtek természetéből származó E2-proteinekkal immunizált csimpánzok szérumával alig mutat reaktivitást [ld. Mustilli és mtsai. (1999) cikkének 5. ábráját]. Ezt Rosa és mtsai. (1996) is leírták, akik kimutatták, hogy az élesztőeredetű HCV-burokproteinekkal végzett immunizálás az immunpróba-  
10 próbával szemben nem biztosított védelmet.

Mindezek alapján, olyan hatékony expressziós rendszerekre van szükség, amelyek a proteinek nagy mennyiségben történő, gazdaságos előállítását teszik lehetővé, mely proteinek-  
re, ugyanakkor, natív (terminális  $\alpha 1,3$ -kötött mannózek nélküli) glikozilációs mintázat jellemző. Közelebbről, ilyen rendszerekre a HCV-burokproteinek termeltetése céljából van szükség.

15 A találmány egyik szempontjának megfelelően izolált HCV-burokproteint vagy - legalább egy N-glikozilációs helyet tartalmazó – fragmensét tárjuk fel, mely protein vagy proteinfragmens eukarióta sejtekben végzett expresszáltatás terméke, továbbá N-glikozilációs helyeinek átlagosan legfeljebb 80 %-a „core”-glikozilált. Közelebbről, a találmány szerinti HCV-burokprotein „core”-glikozilált helyeinek több, mint 70 %-a Man(8-10)-GlcNAc(2) szer-  
20 kezetű oligomannózzal van glikozilálva. Ezen túlmenően, a Man(7)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannóz Man(8)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózhoz viszonyított aránya legfeljebb 0,45. A szóban forgó oligomannózek 10 %-nál kevesebb terminális  $\alpha 1,3$ -mannózt tartalmaznak. Az izolált HCV-burokproteint vagy annak részletét expresszáló eukarióta sejt élesztősejt, például, *Hansenula* sejt.

25 A találmány egy következő szempontjának megfelelően olyan, találmány szerinti izolált HCV-burokproteint vagy részletét tárjuk fel, amelyhez madáreredetű lizozim vezetőpeptidje vagy annak funkcionális változata kapcsolódik. Közelebbről, a szóban forgó izolált HCV-burokprotein vagy részlete a következő szerkezetű proteinből származik:



30 amelyben „CL” jelentése: madáreredetű lizozim vezetőszekvenciája vagy funkcionális megfelelője;

„A1”, „A2”, „A3” és „A4” jelentése: adapterpeptidek, amelyek azonosak vagy különbözők lehetnek;

„PS1” és „PS2” jelentése: érési („processing”) helyek, melyek azonosak vagy különbözők lehetnek;

„HCVENV” jelentése: HCV-burokprotein vagy részlete;

„a”, „b”, „c”, „d”, „e” és „f” értéke: 0 vagy 1; és

5 adott esetben, A1 és/vagy A2 a PS1 része, és/vagy A3 és/vagy A4 a PS2 része.

A találmány egy további szempontjának megfelelően olyan, találmány szerinti izolált HCV-burokproteint vagy fragmensét tárjuk fel, amely monomer, homodimer, heterodimer, homo-oligomer vagy hetero-oligomer szerkezetű. Más módon, a szóban forgó izolált HCV-burokprotein vagy fragmense vírusszerű részecskében helyezkedik el. Közelebbről, a találmány szerinti izolált HCV-burokproteinek és fragmensek bármelyike tartalmazhat olyan ciszteineket, amelyek tiolcsoportja kémiai módon módosítva van.

A találmány specifikus megvalósítási módjai értelmében olyan izolált HCV-burokproteineket vagy –proteinfragmenseket tárunk fel, amelyek antigénhatásúak vagy immunogének és/vagy T-sejt-stimuláló epitópot tartalmaznak.

15 A találmány egy következő szempontjának megfelelően feltárunk egy készítményt, amely találmány szerinti izolált HCV-burokproteint vagy -proteinfragmenst tartalmaz. A találmány szerinti készítmény további komponensként gyógyászati szempontból elfogadható hordozót tartalmazhat, és gyógyszerként vagy vakcinaként prezentálható.

20 Feltárunk továbbá egy eljárást találmány szerinti izolált HCV-burokprotein vagy –proteinfragmens előállítására.

Szintén a találmány tárgyához tartozik egy eljárás anti-HCV antitestek jelenlétének – feltételezhetően anti-HCV antitesteket tartalmazó mintában történő – kimutatására, mely eljárás a következő lépésekből áll:

25 (i) az 1-15. igénypontok bármelyike szerinti HCV-burokproteint vagy részletét olyan feltételek mellett érintkeztetjük a mintával, amelyek lehetővé teszik a HCV-burokprotein vagy részlete anti-HCV antitestekkel történő komplexálódását;

(ii) kimutatjuk az (i) lépésben kialakult komplexet; és

(iii) az (ii) lépésben végzett kimutatás alapján következtetünk az anti-HCV antitestek jelenlétére a mintában.

30 Az egyik speciális megvalósítási mód szerint az eljárás (i) lépésében az érintkeztetést kompetitív feltételek mellett végezzük. Az eljárás végrehajtására szilárd hordozót alkalmazhatunk, amelyen a HCV-burokproteint vagy részletét rögzítettük.

A találmány további szempontjának megfelelően diagnosztikai készletet tárunk fel anti-HCV antitestek jelenlétének – feltételezhetően anti-HCV antitesteket tartalmazó – mintában történő kimutatására, mely készlet szilárd hordozón rögzített, találmány szerinti HCV-burokproteint vagy -proteinrészletet tartalmaz.

5 Feltárunk továbbá egy gyógyszert vagy vakcinát, amely találmány szerinti HCV-burokproteint vagy -proteinrészletet tartalmaz.

Ezen túlmenően, gyógyászati készítményt tárunk fel HCV-specifikus immunreakció emlősbén történő indukálására, mely készítmény találmány szerinti HCV-burokprotein vagy részlete hatásos mennyiségét, és – adott esetben - gyógyászati szempontból elfogadható adjuvánst tartalmaz. Más megvalósítási módok értelmében a találmány szerinti gyógyászati készítmény emlősbén HCV-specifikus antitestek termelődésének indukálására, illetve emlősbén T-sejt-funkció indukálására képes. További megvalósítási módok értelmében a találmány szerinti készítmény profilaktikus, illetve terápiás készítmény. Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány szerinti gyógyászati készítmény HCV-specifikus immunreakció emberekben történő indukálására szolgál.

A következőkben az ábrák rövid leírását ismertetjük.

Az 1. ábrán a pGEMT-E1sH6RB-vektor sematikus térképe látható be (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 6. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

20 A 2. ábrán a pCHH-Hir-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 9. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 3. ábrán a pFPMT121-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 12. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 4. ábrán a pFPMT-CHH-E1-H6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 13. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

25 Az 5. ábrán a pFPMT-MFa-E1-H6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 16. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 6. ábrán a pUC18-FMD-MFa-E1-H6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 17. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

30 A 7. ábrán a pUC18-FMD-CL-E1-H6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 20. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 8. ábrán a pFPMT-CL-E1-H6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 21. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 9. ábrán a pSP72E2H6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 22. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 10. ábrán a pMPT121-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 23. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

5 A 11. ábrán a pFPMT-MFa-E2-H6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 24. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 12. ábrán a pMPT-MFa-E2-H6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 25. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

10 A 13. ábrán a pMF30-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 28. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 14. ábrán a pFPMT-CL-E2-H6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 32. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 15. ábrán a pUC18-FMD-CL-E1-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 35. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

15 A 16. ábrán a pFPMT-CL-E1-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 36. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 17. ábrán a pUC18-FMD-CL-H6-E1-K-H6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 39. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

20 A 18. ábrán a pFPMT-CL-H6-K-E1-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 40. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 19. ábrán a pYIG5-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 41. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 20. ábrán a pYIG5E1H6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 42. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

25 A 21. ábrán a pSY1-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 43. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 22. ábrán a pSY1aMFE1sH6a-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 44. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

30 A 23. ábrán a pBSK-E2sH6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 45. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 24. ábrán a pYIG5HCCL-22aH6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 46. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 25. ábrán a pYYIGSE2H6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 47. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 26. ábrán a pYIG7-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 48. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

5 A 27. ábrán a pYIG7E1-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 49. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 28. ábrán a pSY1YIG7E1s-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 50. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

10 A 29. ábrán a pPICZalphaA-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 51. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 30. ábrán a pPICZalphaD'-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 52. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 31. ábrán a pPICZalphaE'-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 53. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

15 A 32. ábrán a pPICZalphaD'E1sH6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 58. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 33. ábrán a pPICZalphaE'E1sH6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 59. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

20 A 34. ábrán a pPICZalphaD'E2sH6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 60. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 35. ábrán a pPICZalphaE'E2sH6-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 61. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

A 36. ábrán a pUC18MFa-vektor sematikus térképe látható (a vektor szekvenciáját a szekvencialista 62. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be).

25 A 37. ábrán az MF $\alpha$ -E2-H6-ot expresszáló *Hansenula polymorpha* által termelt, IMAC-kromatográfiával tisztított E2-H6-protein méretszelekciós kromatográfiás elúciós görbét mutatjuk be (ld. 15. példa). Az x-tengelyen az elúciós térfogatot (mL) tüntettük fel. Az elúciós görbén a függőleges vonalak a gyűjtött frakciókat jelzik. „P1”: 4-9. összeöntött frakciók; „P2”: 30-35. összeöntött frakciók; „P3”: 37-44. összeöntött frakciók. Az y-tengelyen az abszorbanciát (mAU = milliabszorbancia egységeken), az x-tengelyen pedig az elúciós térfogatot (mL) tüntetjük fel.

30

A 38. ábrán a méretszelekciós kromatográfiával kapott frakciók és összeöntött frakciók (ld. 37. ábra) nem redukáló feltételekkel végzett SDS-PAGE-analízisének (a poliakrilamid-

gél ezüstfestésével láthatóvá tett) eredményeit mutatjuk be. A vizsgált összeöntött frakciókat (P1, P2 és P3), illetve az önálló frakciókat (16-26. frakciók) a gél ábrázoló kép tetején tüntetjük fel. A kép bal oldalán (az „M” sávban) a molekulatömeg-markerek mérete látható.

39. ábra: a méretszelekciós kromatográfiával kapott 17-23. frakciókat (ld. 37. ábra) összeöntöttük és alkileztük, majd a proteinmintát deglikozilálás céljából Endo-H-kezelésnek vetettük alá. A nem kezelt anyagot és az Endo-H-val kezelt anyagot SDS-PAGE-gélben elválasztottuk és PVDF-membránra másoltuk. A blot-ot amidfeketével festettük.

1. sáv: alkilezett E2-H6 (Endo-H-val végzett kezelés előtt); 2. sáv: alkilezett E2-H6 (Endo-H-val végzett kezelés után).

A 40. ábrán E1-et expresszáló *Saccharomyces cerevisiae* sejtizátumaival végzett western-blot analízis eredményét mutatjuk be. A western-blotot E1-specifikus monoklonális antitest (IGH 201) alkalmazásával tettük láthatóvá.

1-4. sáv: a csirkeeredetű lizozim vezetőpeptidjéhez kapcsolt E1-H6-proteint kódoló nukleotidszekvenciát tartalmazó pSY1YIG7E1s-vektorral (50. azonosítószámú szekvencia; 28.

ábra) transzformált *Saccharomyces*-klónban 2, 3, 5, illetve 7 napos expresszió után kapott expressziós termék;

5-7. sáv: az „ $\alpha$ -mating” faktor vezetőpeptidjéhez kapcsolt E1-H6-proteint kódoló nukleotidszekvenciát tartalmazó pSY1aMFE1sH6aYIG1-vektorral (44. azonosítószámú szekvencia; 22. ábra) transzformált *Saccharomyces*-klónban 2, 3, illetve 5 napos expresszió után

kapott expressziós termék;

8. sáv: molekulatömeg-markerek;

9. sáv: HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sejtek által termelt, tisztított E1-proteinek.

A 41. ábrán a *H. polymorpha* sejtekben expresszált és érési folyamat („processing”) során CL-E2-H6-proteinből E2-H6-proteinné átalakított, immobilizált fémion-affinitási kromatográfiával (IMAC) tisztított E2-H6-protein analízisének eredményeit mutatjuk be. A különböző mosófrakciókban lévő proteinek (2-4. sávok) és eluált frakciókban lévő proteinek (5-7. sávok) redukáló SDS-PAGE-elektroforézissel, majd a gél ezüstszínezéssel végzett festésével (41/A ábra), illetve E2 elleni specifikus monoklonális antitest alkalmazásával végzett western-blot analízissel (41/B ábra) vizsgáltuk. A molekulatömeg-markerek méretét a bal oldalon tüntettük fel.

A 42. ábrán *H. polymorpha* sejtek által termelt, szulfonált H6-K-E1-protein tisztítására alkalmazott - Ni-IDA-oszlopon ( $\text{Ni}^{2+}$ -kal töltött „Chelating Sepharose FF” oszlop;

Pharmacia) végzett - IMAC-kromatográfiás tisztítási lépés elúciós görbáját mutatjuk be (ld. 18. példa). Az oszlopot – 20 mM imidazollal kiegészített - „A” pufferrel [6 M GuHCl-ot és 1 % Empigen-BB-t tartalmazó 50 mM foszfátpuffer (pH=7,2)] ekvibráltunk. A minta felvitele után az oszlopot 20 mM imidazolt tartalmazó „A”-pufferrel, majd 50 mM imidazolt tartalmazó „A”-pufferrel mostuk (ld. a kromatogramon). A His-toldalékot tartalmazó termékek további mosási és elúciós lépését 50 mM, illetve 200 mM imidazollal kiegészített „B” puffer (1 % Empigen-t tartalmazó foszfátpufferelt sóoldat, pH = 7,2) egymás utáni alkalmazásával végeztük (ld. a kromatogramon). Az 50 mM imidazolt tartalmazó mosóoldattal kapott 8-11. frakciókat összeöntöttük (1. mosó-összeöntés). Az eluált anyagot különálló frakciókként (63-72. frakciók) gyűjtöttük vagy elúciós összeöntést (63-69. frakciók) készítettünk. Az Y-tengelyen az abszorbanciát (mAU = milliabszorbancia egységekben), az x-tengelyen pedig az elúciós térfogatot (mL) tüntetjük fel.

A 43. ábrán a *H. polymorpha* sejtekben expresszált és érési folyamat („processing”) során CL-H6-K-E1-proteinből H6-K-E1-proteinné átalakított, immobilizált fémion-affinitási kromatográfiával (IMAC) tisztított (ld. 42. ábra) H6-K-E1-protein analízisének eredményeit mutatjuk be. Az mosó-összeöntésben lévő proteineket (12. sáv) és a 63-72. eluált frakciókban lévő proteineket (2-11. sávok) redukáló SDS-PAGE-elektroforézissel, majd a gél ezüstsínezéssel végzett festésével (43/A ábra) analizáltuk. Az IMAC-kromatográfiás tisztítás előtti mintában lévő proteineket (2. sáv), az elfolyóban lévő proteineket (4. sáv), az 1. mosó-összeöntésben lévő proteineket (5. sáv) és az eluált frakciók összeöntésében lévő proteineket (6. sáv) E1 elleni specifikus monoklonális antitest alkalmazásával végzett western-blot analízissel (41/B ábra; a 3. sávra nem vittünk fel mintát) vizsgáltuk. A molekulatömeg-markerek méretét a bal oldalon tüntettük fel („M” sáv).

A 44. ábrán a H6-K-E1-protein Endo Lys-C alkalmazásával végzett *in vitro* érési eredményeként kapott E1-protein tisztítására alkalmazott - Ni-IDA-oszlopon (Ni<sup>2+</sup>-kal töltött „Chelating Sepharose FF” oszlop; Pharmacia) végzett - IMAC-kromatográfiás tisztítási lépés elúciós görbáját mutatjuk be (a tisztítás menetét illetően ld. a 42. ábra leírását). Az átfolyót külön frakciókként (1-40. frakciók) gyűjtöttük össze, s ezeket Els-termékek jelenlétére szkrineltük. A H6-K-E1 hasításával képződött, intakt E1-proteint tartalmazó frakciókat (7-28. frakciók) összeöntöttük. Az Y-tengelyen az abszorbanciát (mAU = milliabszorbancia egységekben), az x-tengelyen pedig az elúciós térfogatot (mL) tüntetjük fel.

A 45. ábrán biotinilált heparinnal reagáló specifikus Els-proteincsíkokat láthatóvá tevő western-blot látható (ld. még a 19. példát). A western-blot analízissel HCV-rekombináns

vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sejtek tenyészetéből tisztított vagy *H. polymorpha* által expresszált E1s-készítményeket vizsgáltunk. A függőleges vonaltól jobbra látható képen biotinilált E1-specifikus monoklonális antitesttel (IGH200) láthatóvá tett western-blot látható, míg a bal oldali képen biotinilált heparinnal láthatóvá tett western-blotot mutatunk be. A kapott eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy főleg a kisebb mértékben glikozilált E1s-protein kötődik nagy affinitással a heparinhoz.

„M” sávok: molekulatömeg-marker (a molekulatömeg-értékeket a képek bal oldalán tüntettük fel);

1. sávok: emlőseredetű sejtekből származó, és az izolálás során alkilezett E1s;

2. sávok: *H. polymorpha* által expresszált, és az izolálás során szulfonált E1s-H6;

3. sávok: *H. polymorpha* által expresszált, és az izolálás során alkilezett E1s-H6;

4. sávok: a 2. sávra felvitt anyaggal azonos, de – a szulfonált Cys-tiolcsoportok Cys-tiolcsoporttá történő átalakítása céljából ditiotreitollal kezelt – protein.

A 46. ábrán a *H. polymorpha* sejtek által expresszált, tisztított E2-H6-protein (szulfonált alak) – víruszerű részecskék („VLP”-k) kialakulásának előidézése céljából Empigen-BB helyett betain alkalmazásával – 3 % betaint tartalmazó foszfátpufferelt sóoldattal végzett méretszelekciós kromatográfiájának (SEC) kromatogramját mutatjuk be. A víruszerű részecskéket tartalmazó, további vizsgálatra felhasznált, összeöntött frakciókat kettős nyíllal ( $\leftrightarrow$ ) jelöljük. Az Y-tengelyen az abszorbanciát (mAU = milliabszorbancia egységekben), az x-tengelyen pedig az elúciós térfogatot (mL) tüntetjük fel. További részleteket illetően ld. a 20. példát.

A 47. ábrán *H. polymorpha* sejtek által expresszált, tisztított E2-H6-protein (alkilezett alak) – víruszerű részecskék („VLP”-k) kialakulásának előidézése céljából Empigen-BB helyett betain alkalmazásával – 3 % betaint tartalmazó foszfátpufferelt sóoldattal végzett méretszelekciós kromatográfiájának (SEC) kromatogramját mutatjuk be. A víruszerű részecskéket tartalmazó, összeöntött frakciókat kettős nyíllal ( $\leftrightarrow$ ) jelöljük. Az Y-tengelyen az abszorbanciát (mAU = milliabszorbancia egységekben), az x-tengelyen pedig az elúciós térfogatot (mL) tüntetjük fel. További részleteket illetően ld. a 20. példát.

A 48. ábrán *H. polymorpha* sejtek által expresszált, tisztított E1-protein (szulfonált alak) – víruszerű részecskék („VLP”-k) kialakulásának előidézése céljából Empigen-BB helyett betain alkalmazásával – 3 % betaint tartalmazó foszfátpufferelt sóoldattal végzett méretszelekciós kromatográfiájának (SEC) kromatogramját mutatjuk be. A víruszerű részecskéket tartalmazó, összeöntött frakciókat kettős nyíllal ( $\leftrightarrow$ ) jelöljük. Az Y-tengelyen az abszorbanciát

(mAU = milliabszorbancia egységekben), az x-tengelyen pedig az elúciós térfogatot (mL) tüntetjük fel. További részleteket illetően ld. a 20. példát.

A 49. ábrán *H. polymorpha* sejtek által expresszált, tisztított E2-H6-protein (alkilezett alak) – víruszerű részecskék („VLP”-k) kialakulásának előidézése céljából Empigen-BB helyett betain alkalmazásával – 3 % betaint tartalmazó foszfátpufferelt sóoldattal végzett méretszelekciós kromatográfiájának (SEC) kromatogramját mutatjuk be. A víruszerű részecskéket tartalmazó, összeöntött frakciókat kettős nyíllal ( $\leftrightarrow$ ) jelöljük. Az Y-tengelyen az abszorbanciát (mAU = milliabszorbancia egységekben), az x-tengelyen pedig az elúciós térfogatot (mL) tüntetjük fel. További részleteket illetően ld. a 20. példát.

Az 50. ábrán a 48. és 49. ábra leírásában ismertetett méretszelekciós kromatográfiát (SEC) követően izolált víruszerű részecskék redukáló feltételek mellett végzett SDS-PAGE analízisének és western-blot analízisének eredményét szemléltetjük. Az ábra bal oldalán ezüstszínezéssel festett SDS-PAGE-gél, míg az ábra jobb oldalán E1 elleni specifikus monoklonális antitest alkalmazásával láthatóvá tett western-blot látható.

1. sávok: molekulatömeg-markerek (a molekulatömeg-értékeket a bal oldalon tüntettük fel);  
2. sávok: szulfonált E1-proteinből létrehozott víruszerű részecskéket tartalmazó összeöntött frakciók (vö. a 48. ábrával);  
3. sávok: alkilezett E1-proteinből létrehozott víruszerű részecskéket tartalmazó összeöntött frakciók (vö. a 49. ábrával).

További részleteket illetően ld. a 20. példát.

Az 51. ábrán emlőseredetű sejtekben termelt E1-proteinnel vakcinált egerek szérumában (felső panel), illetve *Hansenula* sejtek által termelt E1-proteinnel vakcinált egerek szérumában (alsó panel) jelen lévő antitestek végpont-titerének meghatározása céljából végzett ELISA-teszt eredményét szemléltetjük. A teszteket emlőseredetű sejtekben termelt E1-proteinnel („M”) vagy *Hansenula* sejtekben termelt E1-proteinnel („H”) bevont ELISA-tálcákon végeztük. Az ábrán a vízszintes vonal az antitest-titer átlagát reprezentálja. A végpont-titerek (x-szeres hígítás értékként) az y-tengelyen tüntettük fel. További részleteket illetően ld. a 22. példát.

Az 52. ábrán *Hansenula* sejtekben termelt, alkilezett E1-proteinnel vakcinált egerek szérumában (felső panel), illetve *Hansenula* sejtek által termelt, szulfonált E1-proteinnel vakcinált egerek szérumában (alsó panel) jelen lévő antitestek végpont-titerének meghatározása céljából végzett ELISA-teszt eredményét szemléltetjük. A teszteket *Hansenula* sejtekben termelt, alkilezett („A”), illetve szulfonált („S”) E1-proteinnel bevont ELISA-tálcákon végez-

tük. Az ábrán a vízszintes vonal az átlagos antitest-titert reprezentálja. A végpont-titerek ( $\times$ -szeres hígítás értékként) az y-tengelyen tüntették fel. További részleteket illetően ld. a 23. példát.

Az 53. ábrán HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sejtek által termelt HCV-E1-protein és *H. polymorpha* sejtek által termelt HCV-E1-protein - emlőseredetű sejtek által termelt E1-proteinnel vakcinált - csimpánzok szérumával (felső panel), illetve - emlőseredetű sejtek által termelt E1-protein ellen termeltetett - egérs eredetű monoklonális antitestekkel (alsó panel) mutatott reaktivitásának összehasonlítása céljából végzett ELISA-tesztek eredményeit mutatjuk be. Az antitestek végpont-titerének meghatározása érdekében a tesztek HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sejtek által termelt HCV-E1-proteinnel közvetlenül bevont ELISA-tálcákon (fekete oszlopok), illetve *Hansenula* sejtek által termelt HCV-E1-proteinnel közvetlenül bevont ELISA-tálcákon (fehér oszlopok) végeztük. A Yoran és Marti nevű csimpánzokat megelőzésszerűen vakcináltuk, míg a Ton, Phil, Marcel, Peggy és Femma nevű csimpánzokat terápiás módon vakcináltuk. A végpont-titerek ( $\times$ -szeres hígítás értékként) az y-tengelyen tüntették fel. További részleteket illetően ld. a 24. példát.

Az 54. ábrán rekombináns vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sejtek által termelt E1-proteinről, illetve *Hansenula* sejtek által termelt E1-H6-proteinről felszabadított oligoszacharidok fluorofórral segített szénhidrát-gélelektroforézisének eredményét mutatjuk be.

1. sáv: standard glükóz-létra [bal oldalán feltüntetve a monoszacharidok száma 3-tól 10-ig (G3-G10)];
2. sáv: emlőseredetű sejtek által termelt (alkilezett) E1-proteinről felszabadított 25  $\mu$ g N-kötött oligoszacharid;
3. sáv: *Hansenula* sejtek által termelt (alkilezett) E1-proteinről felszabadított 25  $\mu$ g N-kötött oligoszacharid;
4. sáv: 100 pmol maltotetróz.

További részleteket illetően ld. a 25. példát.

Az 55. ábrán referencia oligomannózok - Man-9 (55/A ábra), Man-8 (55/B ábra), Man-7 (55/C ábra), Man-6 (55/D ábra) és Man-5 (55/E ábra) - egyszerűsített szerkezetét mutatjuk be. Az alkalmazott rövidítések jelentése a következő: „Man” = mannóz; „GlcNAc” = N-acetilglükózamin; „ $\alpha$ ” = két mannóz közötti  $\alpha$ -kötés; „ $\beta$ ” = két mannóz közötti  $\beta$ -kötés; „(1-3)”, „(1-4)” és „(1-6)” = két mannóz közötti (1-3), (1-4), illetve (1-6) kötés. Az 55/B és 55/C

ábrán feltüntetett zárójelek azt jelzik, hogy a zárójel bal oldalán látható két, illetve egy mannózyök  $\alpha(1-2)$  kötessel a zárójeltől jobbra látható három mannózyök közül kettőhöz, illetve egyhez kapcsolódik. További részleteket illetően ld. a 26. példát.

Az 56. ábrán egy magasabb polimerizációs fokú oligomannózt mutatunk be, amely  
5 kitobiózhhoz kapcsolt 10 mannózyökből áll. Mindegyik láncvégi mannózyök  $\alpha 1-3$  kötessel kapcsolódik egy nem láncvégi mannózyökhöz. A felfelé mutató vékony nyilak az  $\alpha 1-2$  mannozidáz általi hasításra hajlamos oligoszacharid-kötéseket jelzik (ebben az oligomannózbán ilyenek nincsenek); a felfelé vagy balra mutató vastag nyilak az  $\alpha$ -mannozidáz általi hasításra – az  $\alpha 1-2$  kötésű mannózyok eltávolítása után – hajlamos oligoszacharid-kötéseket (ezen az  
10 oligomannózon nem alkalmazható); míg a lefelé mutató, vastag fehér nyilak a  $\beta$ -mannozidáz általi hasításra – az  $\alpha$ -kötésű mannózyok eltávolítása után – fogékony oligoszacharid-kötéseket jelzi. További részleteket illetően ld. a 26. példát.

Az 57. ábrán olyan magasabb polimerizációs fokú oligomannóz látható, amely kito-  
biózhhoz kapcsolt kilenc mannózyökből áll. Ebben az oligomannózbán egy láncvégi mannó-  
15 zyök  $\alpha 1-2$  kötessel kapcsolódik a nem láncvégi mannózyökhöz. A felfelé mutató, vékony nyilak az  $\alpha 1-2$  mannozidáz általi hasításra hajlamos oligoszacharid-kötéseket jelzik; a felfelé vagy balra mutató, vastag nyilak az  $\alpha$ -mannozidáz általi hasításra – az  $\alpha 1-2$  kötésű mannózyok eltávolítása után – hajlamos oligoszacharid-kötéseket; míg a lefelé mutató, vastag fehér nyilak a  $\beta$ -mannozidáz általi hasításra – az  $\alpha$ -kötésű mannózyok eltávolítása után – fogékony  
20 oligoszacharid-kötéseket jelzi. További részleteket illetően ld. a 26. példát.

Az 58. ábrán a magasabb polimerizációs fokú Man-9 referencia oligomannózt mutat-  
juk be, amely kitobiózhhoz kapcsolt kilenc mannózyökből áll. Ebben az oligomannózbán vala-  
mennyi láncvégi mannózyök  $\alpha 1-2$  kötessel kapcsolódik egy nem láncvégi mannózyökhöz. A  
felfelé mutató, vékony nyilak az  $\alpha 1-2$  mannozidáz általi hasításra hajlamos oligoszacharid-  
25 kötések jelzik; a felfelé vagy balra mutató, vastag nyilak az  $\alpha$ -mannozidáz általi hasításra – az  $\alpha 1-2$  kötésű mannózyok eltávolítása után – hajlamos oligoszacharid-kötéseket; míg a lefelé mutató, vastag fehér nyilak a  $\beta$ -mannozidáz általi hasításra – az  $\alpha$ -kötésű mannózyok eltávolítása után – fogékony oligoszacharid-kötéseket jelzi. További részleteket illetően ld. a 26. példát.

Az 59. ábrán a magasabb polimerizációs fokú Man-8 referencia oligomannózt mutat-  
30juk be, amely kitobiózhhoz kapcsolt nyolc mannózyökből áll. Ebben az oligomannózbán vala-  
mennyi láncvégi mannózyök  $\alpha 1-3$  vagy  $\alpha 1-6$  kötessel kapcsolódik egy nem láncvégi mannózyökhöz, miáltal ez a struktúra teljes mértékben rezisztens az  $\alpha 1-2$  mannozidáz általi

hasítással szemben. A felfelé mutató, vastag nyilak az  $\alpha$ -mannozidáz általi hasításra hajlamos oligoszacharid-kötéseket; míg a lefelé mutató, vastag fehér nyilak a  $\beta$ -mannozidáz általi hasításra – az  $\alpha$ -kötésű mannózok eltávolítása után – fogékony oligoszacharid-kötéseket jelzi. További részleteket illetően ld. a 26. példát.

5 A 60. ábrán a magasabb polimerizációs fokú Man-7 referencia oligomannózt mutatjuk be, amely kitobiózhoz kapcsolt hét mannózgyökből áll. Ebben az oligomannózból valamennyi láncvégi mannózgyök  $\alpha$ 1-3 kötéssel kapcsolódik egy nem láncvégi mannózgyökhöz, ami ezt a struktúrát teljes mértékben rezisztenssé teszi az  $\alpha$ 1-2 mannozidáz általi hasítással szemben. A felfelé mutató, vastag nyilak az  $\alpha$ -mannozidáz általi hasításra hajlamos oligoszacharid-  
10 kötéseket; míg a lefelé mutató, vastag fehér nyilak a  $\beta$ -mannozidáz általi hasításra – az  $\alpha$ -kötésű mannózok eltávolítása után – fogékony oligoszacharid-kötéseket jelzi. További részleteket illetően ld. a 26. példát.

A 61. ábrán egy magasabb polimerizációs fokú oligomannózt mutatunk be, amely kitobiózhoz kapcsolt kilenc mannózgyökből áll. Ebben az oligomannózból egy láncvégi mannózgyök  $\alpha$ 1-2 kötéssel kapcsolódik a nem láncvégi mannózgyökhöz. A felfelé mutató, vékony nyilak az  $\alpha$ 1-2 mannozidáz általi hasításra hajlamos oligoszacharid-kötéseket jelzik; a felfelé vagy balra mutató, vastag nyilak azokat az oligoszacharid-kötéseket jelzik, amelyek – az  $\alpha$ 1-2 kötésű mannózok eltávolítása után –  $\alpha$ -mannozidáz általi hasításra hajlamosak; míg a lefelé mutató, vastag fehér nyilak azokat az oligoszacharid-kötéseket jelzik, amelyek – az  $\alpha$ -  
20 kötésű mannózok eltávolítása után – fogékonyak a  $\beta$ -mannozidáz általi hasításra. További részleteket illetően ld. a 26. példát.

A 62. ábrán olyan feltételezett glükóztartalmú oligoszacharidot mutatunk be, amely kitobiózhoz kapcsolva egy vagy két glükózgyököt és nyolc mannózgyököt tartalmaz. Ebben az oligoszacharidban az „A” vagy „B” ágon ( $A \rightarrow$ , illetve  $B \rightarrow$ ) lévő láncvégi  $\alpha$ 1-2 kötésű mannózgyökök bármelyike egy vagy két glükózgyököt hordoz (amit a zárójel bal oldalán „(Glc)Glc” jelöl). A felfelé mutató, vékony nyilak az  $\alpha$ 1-2 mannozidáz általi hasításra hajlamos oligoszacharid-kötéseket jelzik (feltéve, hogy a láncvégi mannózgyökhöz nem kapcsolódik glükóz); a felfelé vagy balra mutató, vastag nyilak azokat az oligoszacharid-kötéseket jelzik, amelyek – az  $\alpha$ 1-2 kötésű mannózok eltávolítása után –  $\alpha$ -mannozidáz általi hasításra hajlamosak; míg a lefelé mutató, vastag fehér nyilak azokat az oligoszacharid-kötéseket jelzik, amelyek – az  $\alpha$ -kötésű mannózok eltávolítása után – fogékonyak a  $\beta$ -mannozidáz általi hasításra. A lehetséges reakciótermékek áttekintését a 26. példa 10. táblázatában mutatjuk be.

A 63. ábrán a Man-9 (exoglikozidázok jelenlétében vagy hiányában végzett) egy éjszakás inkubálásával kapott reakciótermékek Waters Alliance HPLC-állomáshoz kapcsolt „TSK gel-Amide-80” oszlopon (0,46 x 25 cm; Tosoh Biosep) végzett elválasztásának kromatogramját mutatjuk be. Az oligoszacharidok elválasztását környezeti hőmérsékleten, 1 mL/perc átfolyási sebességgel végeztük. „A” oldószerként 0,1 % ecetsavat tartalmazó acetonitrilt, „B” oldószerként pedig 0,2 % ecetsavat és 0,2 % trietilamin tartalmazó vizet alkalmaztunk. A 2-AB-vel jelölt oligoszacharidok elválasztását ötszörös oszloptérfogatnyi 28 % „B” oldószer-tartalmú izokratikus eleggyel végzett elúcióval kezdtük, melyet 15 oszloptérfogaton keresztül, lineáris emelkedéssel 45 % „B” oldószer-tartalomig növelve folytattunk. Az eluáló oldószer összetételét a jobb oldali y-tengelyen, a „B” oldószer „A” oldószerre vonatkoztatott térfogat%-aként adjuk meg. Az elúció idejét az x-tengelyen (percekben) adjuk meg. A bal oldali y-tengelyen az eluált, 2-aminobenzamiddal (2-AB) jelölt oligoszacharidok fluoreszcencia-intenzitását tüntetjük fel. A 2-AB gerjesztési hullámhossza 330 nm, az emissziós hullámhossz pedig 420 nm.

Az első görbe (1) az egy éjszakán át exoglikozidázok nélkül inkubált Man-9 elúciós görbéje. A 2. görbe (2) a Man-9  $\alpha$ 1-2 mannozidázzal végzett egy éjszakás inkubálását követően kapott Man-5 és Man-6 elegyének elúcióját mutatja. A 3. és 4. görbén (3, ill. 4) a Man-9  $\alpha$ -mannozidázzal végzett egy órás, illetve egy éjszakás inkubálása után a 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz elúciója látható. Az 5. görbén (5) a Man-9  $\alpha$ -mannozidázzal és  $\beta$ -mannozidázzal végzett egy éjszakás inkubálása után a kitobióz elúciója látható. Az 1-5. görbéket átfedőkként mutatjuk be, minthogy a megfelelő alapszint nem mindegyiknél a nulla szint. A 6. görbe (6) az alkalmazott oldószer-gradienst jelzi.

Az ábra tetején A-tól K-ig jelzett csúcsok (ha jelen vannak), a következőket reprezentálják: A = kitobióz; B = 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz; C = Man-2; D = Man-3; E = Man-4; F = Man-5; G = Man-6; H = Man-7; I = Man-7; J = Man-8; K = Man-10. További részleteket illetően ld. a 26. példát.

A 64. ábrán *Saccharomyces* sejtek által termelt E1s-proteinből származó oligoszacharidok (exoglikozidázok jelenlétében vagy hiányában végzett) egy éjszakás inkubálásával kapott reakciótermékek Waters Alliance HPLC-állomáshoz kapcsolt „TSK gel-Amide-80” oszlopon (0,46 x 25 cm; Tosoh Biosep) végzett elválasztásának kromatogramját mutatjuk be. Az oligoszacharidok elválasztását környezeti hőmérsékleten, 1 mL/perc átfolyási sebességgel végeztük. „A” oldószerként 0,1 % ecetsavat tartalmazó acetonitrilt, „B” oldószerként pedig 0,2 % ecet-

savat és 0,2 % trietilamin tartalmazó vizet alkalmaztunk. A 2-AB-vel jelölt oligoszacharidok elválasztását ötszörös oszloptérfogatnyi 28 % „B” oldószer-tartalmú izokratikus eleggyel végzett elúcióval kezdtük, melyet 15 oszloptérfogaton keresztül, lineáris emelkedéssel 45 % „B” oldószer-tartalomig növelve folytattunk. Az eluáló oldószer összetételét a jobb oldali y-tengelyen, a „B” oldószer „A” oldószerre vonatkoztatott térfogat%-aként adjuk meg. Az elúció idejét az x-tengelyen (percekben) adjuk meg. A bal oldali y-tengelyen az eluált, 2-amino-benzamiddal (2-AB) jelölt oligoszacharidok fluoreszcencia-intenzitását tüntetjük fel. A 2-AB gerjesztési hullámhossza 330 nm, az emissziós hullámhossz pedig 420 nm.

Az első görbe (1) a *Saccharomyces* sejtek által termelt Els-proteinből származó, egy éjszakán át exoglikozidázok nélkül inkubált oligoszacharidok elúciós görbéje. A 2. görbe (2) a *Saccharomyces* sejtek által termelt Els-proteinből származó oligoszacharidok -  $\alpha$ 1-2 mannozidázzal végzett egy éjszakás inkubálást követően kapott - elúciós görbéje. A 3. és 4. görbe (3, ill. 4) a *Saccharomyces* sejtek által termelt Els-proteinből származó oligoszacharidok -  $\alpha$ -mannozidázzal végzett egy órás, illetve egy éjszakás inkubálást követően kapott - elúciós görbéje. Az 5. görbe (5) a *Saccharomyces* sejtek által termelt Els-proteinből származó oligoszacharidok -  $\alpha$ -mannozidázzal és  $\beta$ -mannozidázzal végzett egy éjszakás inkubálást követően kapott - elúciós görbéje. Az 1-5. görbéket átfedőkként mutatjuk be, minthogy a megfelelő alapszint nem mindegyiknél a nulla szint. A 6. görbe (6) az alkalmazott oldószer-gradienst jelzi.

Az ábra tetején A-tól K-ig jelzett csúcsok (ha jelen vannak), a következőket reprezentálják: A = kitobióz; B = 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz; C = Man-2; D = Man-3; E = Man-4; F = Man-5; G = Man-6; H = Man-7; I = Man-7; J = Man-8; K = Man-10. További részleteket illetően ld. a 26. példát.

A 65. ábrán vaccinia vírussal transzfektált emlőseredetű sejtek által termelt Els-proteinből származó oligoszacharidok (exoglikozidázok jelenlétében vagy hiányában végzett) egy éjszakás inkubálásával kapott reakciótermékek Waters Alliance HPLC-állomáshoz kapcsolt „TSK gel-Amide-80” oszlopon (0,46 x 25 cm; Tosoh Biosep) végzett elválasztásának kromatogramját mutatjuk be. Az oligoszacharidok elválasztását környezeti hőmérsékleten, 1 mL/perc átfolyási sebességgel végeztük. „A” oldószerként 0,1 % ecetsavat tartalmazó acetonitrilt, „B” oldószerként pedig 0,2 % ecetsavat és 0,2 % trietilamin tartalmazó vizet alkalmaztunk. A 2-AB-vel jelölt oligoszacharidok elválasztását ötszörös oszloptérfogatnyi 28 % „B” oldószer-tartalmú izokratikus eleggyel végzett elúcióval kezdtük, melyet 15 oszloptérfogaton keresztül, lineáris emelkedéssel 45 % „B” oldószer-tartalomig növelve folytattunk. Az

eluáló oldószer összetételét a jobb oldali y-tengelyen, a „B” oldószer „A” oldószerre vonatkoztatott térfogat%-aként adjuk meg. Az elúció idejét az x-tengelyen (percekben) adjuk meg. A bal oldali y-tengelyen az eluált, 2-aminobenzamiddal (2-AB) jelölt oligoszacharidok fluoreszcencia-intenzitását tüntetjük fel. A 2-AB gerjesztési hullámhossza 330 nm, az emissziós hullámhossz pedig 420 nm.

Az első görbe (1) a vaccinia vírussal transzfektált emlőseredetű sejtek által termelt Els-proteinből származó, egy éjszakán át exoglikozidázok nélkül inkubált oligoszacharidok elúciós görbéje. A 2. görbe (2) a vaccinia vírussal transzfektált emlőseredetű sejtek által termelt Els-proteinből származó oligoszacharidok -  $\alpha$ 1-2 mannozidázzal végzett egy éjszakás inkubálást követően kapott - elúciós görbéje. A 3. és 4. görbe (3, ill. 4) a vaccinia vírussal transzfektált emlőseredetű sejtek által termelt Els-proteinből származó oligoszacharidok -  $\alpha$ -mannozidázzal végzett egy órás, illetve egy éjszakás inkubálást követően kapott - elúciós görbéje. Az 5. görbe (5) a vaccinia vírussal transzfektált emlőseredetű sejtek által termelt Els-proteinből származó oligoszacharidok -  $\alpha$ -mannozidázzal és  $\beta$ -mannozidázzal végzett egy éjszakás inkubálást követően kapott - elúciós görbéje. Az 1-5. görbéket átfedőkként mutatjuk be, minthogy a megfelelő alapszint nem mindegyiknél a nulla szint. A 6. görbe (6) az alkalmazott oldószer-gradienst jelzi.

Az ábra tetején A-tól K-ig jelzett csúcsok (ha jelen vannak), a következőket reprezentálják: A = kitobióz; B = 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz; C = Man-2; D = Man-3; E = Man-4; F = Man-5; G = Man-6; H = Man-7; I = Man-7; J = Man-8; K = Man-10. További részleteket illetően ld. a 26. példát.

A 66. ábrán *Hansenula* sejtek által termelt Els-proteinből származó oligoszacharidok (exoglikozidázok jelenlétében vagy hiányában végzett) egy éjszakás inkubálásával kapott reakciótermékek Waters Alliance HPLC-állomáshoz kapcsolt „TSK gel-Amide-80” oszlopon (0,46 x 25 cm; Tosoh Biosep) végzett elválasztásának kromatogramját mutatjuk be. Az oligoszacharidok elválasztását környezeti hőmérsékleten, 1 mL/perc átfolyási sebességgel végeztük. „A” oldószerként 0,1 % ecetsavat tartalmazó acetonitrilt, „B” oldószerként pedig 0,2 % ecetsavat és 0,2 % trietilamin tartalmazó vizet alkalmaztunk. A 2-AB-vel jelölt oligoszacharidok elválasztását ötszörös oszloptérfogatnyi 28 % „B” oldószer-tartalmú izokratikus eleggyel végzett elúcióval kezdtük, melyet 15 oszloptérfogaton keresztül, lineáris emelkedéssel 45 % „B” oldószer-tartalomig növelve folytattunk. Az eluáló oldószer összetételét a jobb oldali y-tengelyen, a „B” oldószer „A” oldószerre vonatkoztatott térfogat%-aként adjuk meg. Az elú-

ció idejét az x-tengelyen (percekben) adjuk meg. A bal oldali y-tengelyen az eluált, 2-amino-benzamiddal (2-AB) jelölt oligoszacharidok fluoreszcencia-intenzitását tüntetjük fel. A 2-AB gerjesztési hullámhossza 330 nm, az emissziós hullámhossz pedig 420 nm.

Az első görbe (1) a *Hansenula* sejtek által termelt E1s-proteinből származó, egy éjszakán át exoglikozidázok nélkül inkubált oligoszacharidok elúciós görbéje. A 2. görbe (2) a *Hansenula* sejtek által termelt E1s-proteinből származó oligoszacharidok -  $\alpha$ 1-2 mannozidázal végzett egy éjszakás inkubálást követően kapott - elúciós görbéje. A 3. és 4. görbe (3, ill. 4) a *Hansenula* sejtek által termelt E1s-proteinből származó oligoszacharidok -  $\alpha$ -mannozidázal végzett egy éjszakás inkubálást követően kapott - elúciós görbéje. Az 5. görbe (5) a *Hansenula* sejtek által termelt E1s-proteinből származó oligoszacharidok -  $\alpha$ -mannozidázzal és  $\beta$ -mannozidázzal végzett egy éjszakás inkubálást követően kapott - elúciós görbéje. Az 1-5. görbéket átfedőkként mutatjuk be, minthogy a megfelelő alapszint nem mindegyiknél a nulla szint. A 6. görbe (6) az alkalmazott oldószer-gradienst jelzi.

Az ábra tetején A-tól K-ig jelzett csúcsok (ha jelen vannak), a következőket reprezentálják: A = kitobióz; B = 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz; C = Man-2; D = Man-3; E = Man-4; F = Man-5; G = Man-6; H = Man-7; I = Man-7; J = Man-8; K = Man-10. További részleteket illetően ld. a 26. példát.

A 67. ábrán *Hansenula* sejtek által termelt E1-proteinek SDS-PAGE-analízisének és „Coomassie Brilliant Blue” színezéssel végzett festésének eredményét mutatjuk be. 1. sáv: molekulatömeg-markerek (a molekulatömeg-értékeket a bal oldalon, kD-ban adjuk meg); 2. sáv: *Hansenula polymorpha* sejtek által termelt, alkilezett E1s (10  $\mu$ g); 3. sáv: *Hansenula polymorpha* sejtek által termelt, alkilezett E1s (5  $\mu$ g); 4. sáv: *Hansenula polymorpha* sejtek által termelt, alkilezett E1s (2,5  $\mu$ g); 5. sáv: HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött vero-sejtek által termelt, alkilezett E1s (10  $\mu$ g); 6. sáv: HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött vero-sejtek által termelt, alkilezett E1s (5  $\mu$ g); 7. sáv: HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött vero-sejtek által termelt, alkilezett E1s (2,5  $\mu$ g). További részleteket illetően ld. a 27. példát.

A 68. ábrán a HCV-E2-H6-protein aminosav-szekvenciáját (5. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, feltüntetve a deglikozilált protein tripszines hasítással létrehozott fragmenteinek (bekeretezett szakaszok). A glikozilált aszparaginokat a PNGáz-F enzim aszparaginsavakká alakítja – ezeket a szekvencia alatt feltüntetett “\*”-gal jelöljük. Az aszparaginok hajlamosak az Asp-N endoproteináz általi proteolitikus hasításra. Az E2-H6-protein (5. azonosí-

tószámú szekvencia) lehetséges N-glikozilációs helyei a következők (a HCV-glikoprotein számolásának megfelelően): N<sub>417</sub>, N<sub>423</sub>, N<sub>430</sub>, N<sub>448</sub>, N<sub>478</sub>, N<sub>532</sub>, N<sub>540</sub>, N<sub>556</sub>, N<sub>576</sub>, N<sub>623</sub> és N<sub>645</sub> – ezeket a helyeket az ábrán a következő számozással jelöljük: N<sub>34</sub>, N<sub>40</sub>, N<sub>47</sub>, N<sub>65</sub>, N<sub>95</sub>, N<sub>149</sub>, N<sub>157</sub>, N<sub>173</sub>, N<sub>193</sub>, N<sub>240</sub> és N<sub>262</sub>. További részleteket illetően ld. a 27. példát.

5 A találmány kidolgozása során felismertük, hogy *Saccharomyces cerevisiae*-ben, *Pichia pastoris*-ban és *Hansenula polymorpha*-ban lehetséges a glikozilált HCV-burokproteinek szignálpeptidhez kapcsolt proteinek alakjában történő expresszáltatása. Mindazonáltal, e három élesztőfajban termeltetett HCV-burokproteinek glikozilációs mintázata nagyon eltérő volt (ld. a 6., 10., 13. és 25. példát). Közelebbről, a *Saccharomyces cerevisiae* (glikoziláció-  
10 deficiens mutáns törzs) és a *H. polymorpha* által termelt HCV-burokproteinek glikozilációja a „core”-glikozilációra emlékeztet, míg a *Pichia pastoris* által termelt HCV-burokproteinek hiperglikoziláltak, ellentétben azon korábbi leírásokkal, melyek szerint a *Pichia pastoris*-ban termeltetett proteinek normális esetben nem hiperglikoziláltak [Gellissen és mtsai. (2000); Sugrue és mtsai. (1997)].

15 A *Saccharomyces cerevisiae*-ben (glikoziláció-deficiens mutáns törzs), *H. polymorpha*-ban és – HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött - emlőseredetű sejtekben termeltetett HCV-proteinek glikozilációs mintázatának további vizsgálatának eredményeként azt találtuk, hogy a *Hansenula* sejtek által termelt HCV-burokproteinek, meglepő módon, olyan glikozilációs mintázatúak, amely ezen HCV-burokproteinek diagnosztikai, megelőzési és  
20 terápiás célú alkalmazása szempontjából nagyon előnyös (ld. a 21-24. és 26-29. példákat). A találmány különböző megvalósítási módjait e váratlan felismerés alapján dolgoztuk ki.

A találmány egyik szempontjának megfelelően izolált HCV-burokproteint vagy annak – legalább egy N-glikozilációs helyet tartalmazó - fragmensét tárjuk fel, mely protein vagy proteinfragmens eukarióta sejtben lejátszódó expresszió terméke, és N-glikozilációs helyeinek  
25 átlagosan legfeljebb 50 %-a, 51 %-a, 52 %-a, 53 %-a, 54 %-a, 55 %-a, 56 %-a, 57 %-a, 58 %-a, 59 %-a, 60 %-a, 61 %-a, 62 %-a, 63 %-a, 64 %-a, 65 %-a, 66 %-a, 67 %-a, 68 %-a, 69 %-a, 70 %-a, 71 %-a, 72 %-a, 73 %-a, 74 %-a, 75 %-a, 76 %-a, 77 %-a, 78 %-a, 79 %-a vagy 80 %-a „core”-glikozilált. Közelebbről, a szóban forgó protein vagy fragmens N-glikozilációs helyeinek több, mint 60 %-a, 61 %-a, 62 %-a, 63 %-a, 64 %-a, 65 %-a, 66 %-a, 67 %-a, 68  
30 %-a, 69 %-a, 70 %-a, 71 %-a, 72 %-a, 73 %-a, 74 %-a, 75 %-a, 76 %-a, 77 %-a, 78 %-a, 79 %-a, 80 %-a, 81 %-a, 82 %-a, 83 %-a, 84 %-a, 85 %-a, 86 %-a, 87 %-a, 88 %-a, 89 %-a, 90 %-a, 91 %-a, 92 %-a, 93 %-a, 94 %-a vagy 95 %-a Man(8-10)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal van glikozilálva. A felsorolt N-glikozilációs sajátság további részletezéseként,

a Man(7)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal glikozilált helyek számának a Man(8)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal glikozilált helyek számához viszonyított aránya legfeljebb 0,15; 0,2; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,44; 0,45 vagy 0,50. Ezen túlmenően, az oligomannó-  
zok kevesebb, mint 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9  
5 %, 8 %, 7 %, 6 % vagy 5 % terminális  $\alpha$ 1,3-mannózt tartalmaznak.

A „Man(8-10)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal glikozilált N-glikozilációs helyek” kifejezésen azt értjük, hogy a szóban forgó N-glikozilációs helyek Man(8)-GlcNAc(2)-vel, Man(9)-GlcNAc(2)-vel vagy Man(10)-GlcNAc(2)-vel vannak glikozilálva.

Két proteinben ugyanazon N-glikozilációs helyeket más-más oligomannóz foglalhatja  
10 el.

A „protein” kifejezésen aminosavakból álló polimert értünk, függetlenül annak hosszúságától. Ilyenformán, a protein definíciója egyaránt magában foglalja a peptideket, oligopeptideket és polipeptideket. Ezen túlmenően, maga a protein kifejezés nem ad felvilágosítást a protein expresszió után bekövetkezett módosulásairól, így például, glikozilációs,  
15 acetilációs, foszforilációs, stb. állapotáról. A protein definíciójába tartoznak, például, az egy vagy több aminosav-analógot (pl. nem természetes aminosavakat, PNS-eket, stb.) tartalmazó polipeptidok, a behelyettesített kötéseket, illetve egyéb, szakember számára jól ismert (természetes vagy mesterséges) módosításokat tartalmazó polipeptidok.

Ahogy a leírásban használjuk, a „pre-pro-protein” vagy „pre-protein” kifejezésen  
20 olyan proteint értünk, amely a kérdéses proteinhez kapcsolva pre-pro-szekvenciát, illetve pro-szekvenciát tartalmaz. A „pre-szekvencia” alternatív elnevezéseként használjuk a „szignálszekvencia”, „szignálpeptid”, „vezetőpeptid” és „vezetőszekvencia” kifejezéseket is, melyek mindegyike olyan aminosav-szekvenciára vonatkozik, amely a pre-proteint a durva endoplazmatikus retikulumba (ER) irányítja [ami a(z) (N-)glikoziláció elengedhetetlen előfeltétele]. A „szignálszekvenciát”, „szignálpeptidet”, „vezetőpeptidet” vagy „vezetőszekvenciát” az endoplazmatikus retikulum lumen felőli oldalán specifikus proteázok (az ún. szignálpeptidázok) hasítják le (távolítják el) a proteinről. Hasonlóan, a pre-pro-protein az endoplazmatikus retikulum lumenébe történő transzlokáció következtében alakul át pro-proteinné. A „pro”-aminosav-szekvenciát - annak természetétől függően - a pre-pro-proteint expresszáló gazdasejt lehasítja vagy  
25 sem. A pre-pro-aminosav-szekvenciák egy jól ismert példája a *S. cerevisiae* „ $\alpha$ -mating” faktórának pre-pro-szekvenciája.

A „HCV-burokprotein” kifejezés HCV-E1- vagy HCV-E2-burokproteinre (vagy ezek részletére) vonatkozik, mely proteinek tetszőleges genotípusú HCV-törzsből származhatnak.

Közelebbről, a HCV-burokprotein (HCVENV) a 85-98. azonosítószámú aminosav-szekvenciák bármelyikét, illetve a 85-98. azonosítószámú aminosav-szekvenciák bármelyikével legalább 90 %-ban azonos aminosav-szekvenciát tartalmazhat. Az „azonos” aminosavakon konzer-  
vált aminosavak csoportjait értjük, azaz a következő aminosavakból álló csoportokat: Met, Ile,  
5 Leu és Val; Arg, Lys és His; Phe, Trp és Tyr; Asp és Glu; Asn és Gln; Cys, Ser és Thr; illetve Ala és Gly.

Közelebbről, a „HCV-burokprotein” kifejezésen olyan polipeptidet vagy polipeptid-analógot (pl. mimotópot) értünk, amely – glikozilációs helyen kívül - az E1- vagy E2-régió legalább egy HCV-epitópját meghatározó aminosav-szekvenciát (és/vagy aminosav-analógokat)  
10 tartalmaz. Az ilyen burokproteinek rekombináns módszerrel expresszálatott burokproteinek monomer, hetero-oligomer vagy homo-oligomer alakjai lehetnek. Az epitópot meghatározó szekvenciák általában a HCV E1- vagy E2-régiója aminosav-szekvenciájának felelnek meg (vagy teljesen azonosak azzal, vagy egyes natív aminosavak helyett olyan behelyettesített analógokat tartalmaznak, amelyek az epitópot nem károsítják).

15 Megjegyezzük, hogy a HCV-epitóp elhelyezkedése azonos lehet a glikozilációs helyével.

Az epitópot meghatározó aminosav-szekvencia általában három vagy négy, gyakrabban öt, hat vagy hét, még gyakrabban nyolc vagy kilenc, még gyakrabban tíz vagy több aminosavból áll. A konformációs epitópokat illetően, az epitópot meghatározó szekvencia hosszúsága  
20 tag határok között változik, mivel jelenlegi ismereteink szerint ezen epitópok az antigén háromdimenziós szerkezetének kialakulása (azaz hajtogatódása) révén jönnek létre. Ennek megfelelően, az epitópot meghatározó aminosavak száma viszonylag alacsony, de a molekulalánc mentén elszórtan helyezkednek el, s a pontos epitóp-konformáció a molekula hajtogatódásával alakul ki. Az antigén epitópot alkotó aminosavak közötti részletei az epitóp konformációs  
25 szerkezete szempontjából nem kulcsfontosságúak. Például, az e közbeeső szekvenciákban bekövetkező deléciók vagy szubsztitúciók nem feltétlenül befolyásolják az epitóp konformációját, feltéve, hogy az epitóp szerkezetének fenntartása szempontjából kritikus jelentőségű aminosavak (pl. a diszulfidkötés kialakításában szerepet játszó ciszteinek, a glikozilációs helyek, stb.) megmaradnak. Konformációs epitópot hozhat létre egy homo-oligomer vagy hetero-oligomer  
30 alegységeinek két vagy több kulcsfontosságú régiója is.

Ahogy itt használjuk, egy adott polipeptid epitópján az adott polipeptid epitópjának aminosav-szekvenciájával azonos aminosav-szekvenciát tartalmazó epitópokat, illetve azok immunológailag egyenértékű változatait értjük. Az ilyen változatok közé törzs-, altípus-

(=genotípus-), illetve típus- (csoport)-specifikus változatok tartoznak, mint például, a következő genotípusokba tartozó, jelenleg ismert szekvenciák vagy törzsek: 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g, 2h, 2i, 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g, 4h, 4i, 4j, 4k, 4l, 5a, 5b, 6a, 6b, 6c, 7a, 7b, 7c, 8a, 8b, 9a, 9b, 10a, 11. (és altípusai), 12. (és altípusai), és 13. (és altípusai), valamint bármely újabban definiált HCV-(al)típus. Tudni kell, hogy az epitópot alkotó aminosavak nem képezik szükségszerűen egy lineáris szekvencia részét, vagyis az ilyen aminosavak között tetszőleges számú aminosavak helyezkedhetnek el (így alkotva konformációs epitópot).

A találmány szerinti HCV-antigének a HCV E1- és/vagy E2- („envelope”) doménjéből származó konformációs epitópokat tartalmazhatnak. Az E1-domén (amely ismereteink szerint a vírusburok-proteinnek felel meg) a HCV-poliprotein 192-383. aminosavait foglalja magában [Hijikata és mtsai. (1991)]. Emlőseredetű sejtekben expresszáltatva (glikozilált állapotban) SDS-PAGE-analízissel meghatározott molekulatömege hozzávetőleg 35 kD. Úgy tartják, hogy az E2-protein (korábbi nevén NS1) a HCV-poliprotein 384-809. vagy 384-746. aminosavaiból áll [Grakoui és mtsia. (1993)], és szintén burokproteinként funkcionál. Vaccinia rendszerben (glikozilált állapotban) expresszáltatva e protein gélen meghatározott látszólagos molekulatömege kb. 72 kD. Tudni kell, hogy e protein-végpontok csak közelítő adatok (például, az E2 C-terminális vége a 730-820. aminosavak közötti régióban helyezkedik el, pl. a 730., 735., 740., 742., 744., 745., előnyösen a 746., 747., 748., 750., 760., 770., 780., 790., 800., 809., 810. vagy 820. pozícióban). Az E2-protein együttesen is expresszáltatható az E1-proteinnel és/vagy core-proteinnel (1-191. aminosavak) és/vagy P7-proteinnel (747-809. aminosavak) és/vagy NS2-proteinnel (810-1026. aminosavak) és/vagy NS3-proteinnel (1027-1657. aminosavak) és/vagy NS4A-proteinnel (1658-1711. aminosavak) és/vagy NS4B-proteinnel (1712-1972. aminosavak) és/vagy NS5A-proteinnel (1973-2420. aminosavak) és/vagy NS5B-proteinnel (2421-3011. aminosavak) és/vagy e HCV-proteinek bármely, E2-től eltérő részletével. Hasonlóan, az E1-protein együttesen expresszáltatható az NS2-proteinnel és core-proteinnel (1-191. aminosavak) és/vagy P7-proteinnel (747-809. aminosavak) és/vagy NS2-proteinnel (810-1026. aminosavak) és/vagy NS3-proteinnel (1027-1657. aminosavak) és/vagy NS4A-proteinnel (1658-1711. aminosavak) és/vagy NS4B-proteinnel (1712-1972. aminosavak) és/vagy NS5A-proteinnel (1973-2420. aminosavak) és/vagy NS5B-proteinnel (2421-3011. aminosavak) és/vagy e HCV-proteinek bármely, E1-től eltérő részletével. A felsorolt egyéb HCV-proteinekkel végzett együttes expresszáltatás a protein megfelelő harmadlagos szerkezetének kialakulása (hajtogatódása) szempontjából lehet lényeges.

Ahogy itt használjuk, az „E1-protein” kifejezés magában foglalja azokat az analógokat és lerövidített alakokat is, amelyek immunológiailag keresztreaktívak a természetes E1-proteinnel, továbbá, ide tartoznak az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12. vagy 13. genotípusok, illetve az újonnan azonosított HCV-típusok vagy -altípusok E1-proteinjei. Ahogy a leírásban használjuk, az „E2-protein” kifejezés jelentése kiterjed azokra az analógokra és lerövidített alakokra is, amelyek immunológiailag keresztreaktívak a természetes E2-proteinnel, továbbá, ide tartoznak az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12. vagy 13. genotípusok, illetve az újonnan azonosított HCV-típusok vagy -altípusok E2-proteinjei. Például, Kato és mtsai. (1992) a 383. és 384. kodon között több új kodon inszertálásával, illetve a 384-387. aminosavak deléciójával létrehozott változatokat írtak le. Ilyenformán, tudni kell, hogy a példákban alkalmazott izolátumok nem jelentik a találmány igényelt oltalmi körének korlátozását, és az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 12. vagy 13. genotípusok, illetve az újonnan azonosított HCV-típusok vagy -altípusok az E1- és/vagy E2-protein szekvenciájának - találmány szerinti megoldás gyakorlati kivitelezése szempontjából – alkalmas forrásai. Hasonlóan, ahogy fentebb említettük, a találmány szerinti HCV-burokproteinekkel együttesen expresszáltott HCV-proteinek bármely HCV-típusból származhatnak (így akár ugyanazon HCV-típusból, mint a találmány szerinti HCV-burokproteinek).

Ahogy a leírásban használjuk, az „E1/E2” kifejezésen burokproteinek olyan oligomer alakját értjük, amely legalább egy E1-komponenst és legalább egy E2-komponenst tartalmaz.

A „specifikus oligomer” E1 és/vagy E2 és/vagy E1/E2 burokproteineken rekombináns módszerekkel expresszálatott E1- és/vagy E2-burokproteinek olyan lehetséges oligomer alakjait értjük, amelyek nem aggregátumok. Az E1- és/vagy E2-specifikus oligomer burokproteineknek más néven homo-oligomer E1- vagy E2-burokproteineknek nevezzük (ld. később). Az „egyedülálló vagy specifikus oligomer” E1- és/vagy E2- és/vagy E1/E2-burokproteinek kifejezésen egyedülálló, monomer E1- vagy E2-proteinek (az egyedülállót a szó szoros értelmében véve), illetve rekombináns módszerekkel expresszálatott, specifikus oligomer E1- és/vagy E2- és/vagy E1/E2-burokproteinek értünk. A találmány szerinti, egyedülálló vagy specifikus oligomer burokproteinek a következő képlettel írhatók le:  $(E1)_x(E2)_y$ , ahol „x” értéke: 0 és 100 közötti szám; míg „y” értéke: 0 és 100 közötti szám, feltéve, hogy „x” és „y” értéke nem lehet egyszerre 0. Ha  $x = 1$ , és  $y = 0$ , monomer E1-proteinről van szó.

Ahogy a leírásban használjuk, a „homo-oligomer” kifejezés az E1- vagy E2-proteinek-ből álló komplexre vonatkozik, amely egynél több E1- vagy E2-monomert tartalmaz (ilyenek, például, az E1/E1 dimerek, E1/E1/E1 trimerek vagy E1/E1/E1/E1 tetramerek, E2/E2 dimerek,

E2/E2/E2 trimerek vagy E2/E2/E2/E2 tetramerek; E1-pentamerek és -hexamerek; E2-pentamerek és -hexamerek, illetve az E1 vagy E2 bármely magasabb rendű homo-oligomerei). Az oligomerek egy, két vagy több különböző E1- vagy E2-monomert tartalmazhatnak, amelyek különböző hepatitis-C típusokból vagy altípusokból származhatnak (ld., pl. a WO 94/25601 és WO 96/12590 számú nemzetközi közzétételi iratokban feltártakat). Az ilyen ve-  
 5 gyes oligomerek szintén a találmány oltalmi körébe tartozó homo-oligomerek, amelyek a HCV mégy teljesebb (univerzálisabb) diagnosztizálását, megelőzését vagy kezelését teszik lehetővé.

A találmány szerinti megoldás értelmében alkalmazott E1- és E2-antigének teljes hosszúságú virális proteinek, azok lényegében teljes hosszúságú változatai vagy funkcionális  
 10 fragmensei lehetnek (például, legalább egy epitópot és/vagy glikozilációs helyet tartalmazó fragmensek). Ezen túlmenően, a találmány szerinti HCV-antigének egyéb olyan szekvenciákat is tartalmazhatnak, amelyek nem gátolják az adott konformációs epitóp kialakulását. A konformációs epitópok jelenléte vagy hiánya a kérdéses antigén antitesttel (poliklonális szérummal vagy a konformációs epitópra nézve monoklonális antitesttel) végzett szkríneléssel, és reakti-  
 15 vitásának a csak lineáris epitópokat (ha van egyáltalán) tartalmazó denaturált antigénváltozat reaktivitásával történő összehasonlításával egyszerűen meghatározható. A poliklonális antites-  
 tek alkalmazásával végzett szkrínelés során előnyös lehet, ha a poliklonális szérumot először a denaturált antigénnel adszorbeáltatjuk, hogy megfigyelhessük, vajon megtartja-e az antitesteket a kérdéses antigénen.

A találmány szerinti HCV-proteinek glikoziláltak lehetnek. A glikozilált proteinek egy  
 20 vagy több szénhidrátcsoporthoz – közelebről, cukorcsoporthoz – tartalmaznak. Általában valamennyi eukarióta sejt képes a proteinek glikozilálására. A különböző HCV-genotípusú burok-  
 protein-szekvenciák egymás alá rendezéssel végzett összehasonlítása alapján arra következtet-  
 25 hetünk, hogy a HCV-E1-protein megfelelő hajtogatódásához és reaktivitáshoz nincs szükség a protein mind a hat glikozilációs helyére. Ismeretes továbbá, hogy a 325. pozíciónál lévő glikozilációs hely nem N-glikozilációval van módosítva [ld. Fournillier-Jacob és mtsai. (1996),  
 Meunier és mtsai. (1999)]. Ezen túlmenően, az 1b-altípusba tartozó HCV-E1-protein hat glikozilációs helyet tartalmaz, melyek némelyike más (al)típusokba tartozó E1-proteinekből hi-  
 ányzik. Az 1b, 6a, 7., 8. és 9. típusokra jellemző negyedik szénhidrát-motívum (amely a 250.  
 30 aszparagionon található) az eddig ismert összes többi típusból hiányzik. E cukoraddíciós motí-  
 vum mutagenizálásával javított reaktivitású 1b-típusú E1-protein hozható létre. Ezenfelül, a 2b-típusba tartozó szekvenciák V5-régiójában (a 299. aszparagionon) egy extra glikozilációs hely található. A 2c-genotípusba tartozó S83-as izolátumból hiányzik a V1-régió (aszparagion

elhelyezkedő) első szénhidrát-motívuma, amely azonban az összes többi izolátumban megtalálható [ld. Stuyver és mtsai. (1994)]. Mindazonáltal - ahogy még a teljesen konzervált cukor-addíciós motívumok esetében is előfordulhat -, a szénhidrát jelenléte nem feltétlenül szükséges a megfelelő hajtogatódáshoz, de szerepet játszhat az immunológiai felügyelet „kijátszásában”.

5 Ilyenformán, a glikoziláció szerepének megállapítása céljából a glikozilációs motívumok mutagenézisével további vizsgálatok végezhetők. E glikozilációs motívumok (NXS vagy NXT szekvencia) mutagenézise az N, S vagy T kodonjának mutációjával, oly módon hajtható végre, hogy e kodonok N-től eltérő aminosavat (az N esetében) és/vagy S-től vagy T-től eltérő ami-

10 nősavat (az S, illetve a T esetében) kódoljanak. Más módon, az X pozíció P-vel helyettesíthető, mivel ismeretes, hogy az NPS vagy az NPT szekvencia ritkán van szénhidráttal módosítva. Miután megállapítottuk, hogy a megfelelő hajtogatódáshoz és/vagy reaktivitáshoz mely szénhidrát-addíciós motívumok szükségesek és melyek nem, az ilyen mutációkat kombinálhatjuk egymással. E kísérletek részletes leírását illetően ld. a WO 96/04385 számú nemzetközi köz-

zétételi irat 8. példáját (mely forrást teljes terjedelmében a kitanítás részének kell tekinteni).

15 A találmány leírásában használt „glikoziláció” kifejezés, hacsak másképpen nem jelezzük, N-glikozilációra vonatkozik.

A találmány tárgyát HCV-burokproteinek vagy részleteik képezik, amelyek „core”-glikoziláltak. E vonatkozásban a „„core”-glikoziláció” „core”-glikoziláció a Herscovics és Orleans (1993) cikkének (melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének kell tekinteni) 3. ábráján látható, bekeretezett struktúrához „hasonló” struktúrára vonatkozik. Ennek megfelelően,

20 a szénhidrát-struktúra 10-11 monoszacharidot tartalmaz. A „hasonló” kifejezésen azt értjük, hogy a szóban forgó struktúrához legfeljebb négy további monoszacharid van hozzáadva vagy abból legfeljebb kb. három monoszacharid van eltávolítva. Ilyenformán, a találmányunk leírásában említett „core”-glikozilációs szénhidrát-struktúra minimum hét, maximum 15 (például, 8,

25 9, 10, 11, 12, 13 vagy 14) monoszacharidból (elsősorban glükózból, mannózból vagy N-acetilglükózaminból) áll.

A találmány előző szempontjának alternatívájaként, izolált HCV-burokproteint vagy annak – legalább egy N-glikozilációs helyet tartalmazó - fragmensét tárjuk fel, mely protein vagy proteinfragmens eukarióta sejtben lejátszódó expresszió terméke, és N-glikozilációs he-

30 lyeinek több, mint 60 %-a, 61 %-a, 62 %-a, 63 %-a, 64 %-a, 65 %-a, 66 %-a, 67 %-a, 68 %-a, 69 %-a, 70 %-a, 71 %-a, 72 %-a, 73 %-a, 74 %-a, 75 %-a, 76 %-a, 77 %-a, 78 %-a, 79 %-a, 80 %-a, 81 %-a, 82 %-a, 83 %-a, 84 %-a, 85 %-a, 86 %-a, 87 %-a, 88 %-a, 89 %-a, 90 %-a, 91 %-a, 92 %-a, 93 %-a, 94 %-a vagy 95 %-a Man(8-10)-GlcNAc(2) szerkezetű

oligomannózzal van glikozilálva. A felsorolt N-glikozilációs sajátság további részletezéseként, a Man(7)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal glikozilált helyek számának a Man(8)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal glikozilált helyek számához viszonyított aránya legfeljebb 0,15; 0,2; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,44; 0,45 vagy 0,50. Ezen túlmenően, az oligomannózzok kevesebb, mint 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % vagy 5 % terminális  $\alpha$ 1,3-mannózt tartalmaznak.

A találmány előző szempontjának alternatívájaként, izolált HCV-burokproteint vagy annak – legalább egy N-glikozilációs helyet tartalmazó - fragmensét tárjuk fel, mely protein vagy proteinfragmens eukarióta sejtben lejátszódó expresszió terméke, és N-glikozilációs helyeit oligomannózzok foglalják el, ahol is a Man(7)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal glikozilált helyek számának a Man(8)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal glikozilált helyek számához viszonyított aránya legfeljebb 0,15; 0,2; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,44; 0,45 vagy 0,50. Ezen túlmenően, az oligomannózzok kevesebb, mint 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % vagy 5 % terminális  $\alpha$ 1,3-mannózt tartalmaznak.

A találmány előző szempontjának alternatívájaként, izolált HCV-burokproteint vagy annak – legalább egy N-glikozilációs helyet tartalmazó - fragmensét tárjuk fel, mely protein vagy proteinfragmens nem emlőseredetű eukarióta sejtben lejátszódó expresszió terméke, és N-glikozilációs helyeinek száma legalább 5 %-kal, 6 %-kal, 7 %-kal, 8 %-kal, 9 %-kal, 10 %-kal, 11 %-kal, 12 %-kal, 13 %-kal, 14 %-kal vagy 15 %-kal kevesebb, mint az ugyanazon, de - vaccinia vírussal történő megfertőződésre hajlamos - eukarióta sejtben vaccinia vírusból expresszálatott protein vagy proteinfragmens N-glikozilációs helyeinek száma. A szóban forgó protein vagy proteinfragmens glikozilációs tulajdonságainak további részletezéseként, a fenti N-glikozilációs helyek 50 %-a, 51 %-a, 52 %-a, 53 %-a, 54 %-a, 55 %-a, 56 %-a, 57 %-a, 58 %-a, 59 %-a, 60 %-a, 61 %-a, 62 %-a, 63 %-a, 64 %-a, 65 %-a, 66 %-a, 67 %-a, 68 %-a, 69 %-a, 70 %-a, 71 %-a, 72 %-a, 73 %-a, 74 %-a, 75 %-a, 76 %-a, 77 %-a, 78 %-a, 79 %-a vagy 80 %-a „core”-glikozilált. Közelebbről, a szóban forgó protein vagy fragmens N-glikozilációs helyeinek több, mint 60 %-a, 61 %-a, 62 %-a, 63 %-a, 64 %-a, 65 %-a, 66 %-a, 67 %-a, 68 %-a, 69 %-a, 70 %-a, 71 %-a, 72 %-a, 73 %-a, 74 %-a, 75 %-a, 76 %-a, 77 %-a, 78 %-a, 79 %-a, 80 %-a, 81 %-a, 82 %-a, 83 %-a, 84 %-a, 85 %-a, 86 %-a, 87 %-a, 88 %-a, 89 %-a, 90 %-a, 91 %-a, 92 %-a, 93 %-a, 94 %-a vagy 95 %-a Man(8-10)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal van glikozilálva. A felsorolt N-glikozilációs sajátság további részletezéseként, a Man(7)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal glikozilált helyek számának a Man(8)-

GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal glikozilált helyek számához viszonyított aránya legfeljebb 0,15; 0,2; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,44; 0,45 vagy 0,50. Ezen túlmenően, az oligomannózok kevesebb, mint 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % vagy 5 % terminális  $\alpha$ 1,3-mannózt tartalmaznak.

- 5 A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében, a találmány szerinti HCV-burokprotein vagy részlete élesztősejtben lejátszódó expresszió terméke. Közelebbről, a találmány szerinti HCV-burokprotein vagy részlete a következő törzsekbe tartozó sejtekben lejátszódó expresszió terméke: *Saccharomyces* fajok (pl. *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kuyveri* vagy *Saccharomyces uvarum*), *Schizosaccharomyces* fajok (pl. *Schizosaccharomyces pombe*), *Kluyveromyces* fajok (pl. *Kluyveromyces lactis*), *Yarrowia* fa-  
10 *jok* (pl. *Yarrowia lipolytica*), *Hansenula* fajok (pl. *Hansenula polymorpha*), *Pichia* fajok (pl. *Pichia pastoris*), *Aspergillus* fajok, *Neurospora* fajok (pl. *Neurospora crassa*) vagy *Schwanniomyces* fajok (pl. *Schwanniomyces occidentalis*), illetve ezek mutánsai. Közelebbről, a találmány szerinti izolált HCV-burokprotein vagy részlete *Hansenula* sejtben végrehajtott  
15 expresszió terméke. Még előnyösebben, a találmány szerinti izolált HCV-burokprotein vagy részlete élesztősejtben, pl. *Hansenula* sejtben, glikoziláció-inhibitor (pl. tunicamycin) hiányában végrehajtott expresszió terméke.

- A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében, a találmány szerinti HCV-burokprotein vagy részlete olyan proteinből származik, amely a HCV-burokproteint vagy  
20 fragmensét madáreredetű lizozim vezetőpeptidjéhez (vagy funkcionális változatához) kapcsolva tartalmazza. Közelebbről, a találmány szerinti, izolált HCV-burokprotein vagy részlete a következő szerkezeti képletű proteinből származtatható:



ahol

- 25 „CL” jelentése: madáreredetű lizozim vezetőszekvenciája vagy funkcionális megfelelője;  
„A1”, „A2”, „A3” és „A4” jelentése: adapterpeptidek, amelyek azonosak vagy különbözők lehetnek;  
„PS1” és „PS2” jelentése: érési („processing”) helyek, melyek azonosak vagy különbözők lehetnek;  
30 „HCVENV” jelentése: HCV-burokprotein vagy részlete;  
„a”, „b”, „c”, „d”, „e” és „f” értéke: 0 vagy 1; és  
adott esetben, A1 és/vagy A2 a PS1 része, és/vagy A3 és/vagy A4 a PS2 része.

5 N-terminális aminosava között egy peptid vagy protein helyezkedik el, amelynek szerkezete a fentebb definiált  $-(A1)_a-(PS1)_b-(A2)_c$ .

10 letét madáreredetű lizozim-vezetőpeptidhez vagy funkcionális megfigyeléséhez kapcsolva tartalmazza. Közelebbről, a madáreredetű vezetőpeptid eltávolítási lépése *in vivo* azon sejtek proteolitikus mechanizmusának alkalmazásával hajtható végre, amelyekben a pre-proteint expresszáltattuk. Mindazonáltal, a HCV-burokproteinhez leszármaztathatjuk oly módon is, hogy a pre-protein hasítását a pre-proteint expresszáló sejtekből (vagy azok tenyésztő oldatából) történő izolálása és/vagy tisztítása után és/vagy azzal egyidejűleg *in vitro* hajtjuk végre. 15 Más módon, az *in vivo* módszert az *in vitro* módszerrel kombinálhatjuk. A HCV-burokprotein rekombináns módon expresszáltatott pre-proteinből történő leszármaztatása magában foglalhat egy „polírozó” lépést is, melynek során a HCV-burokproteinről - proteolitikus enzim(ek) alkalmazásával (amelyekkel szemben a kérdéses protein rezisztens) - lebontjuk a proteinnel együtt jelen lévő szennyező proteinek mindegyikét vagy többségét. A vezetőpeptid lehasítása és a „polírozás” nem összeférhetetlen eljárások, és akár ugyanazon proteolitikus enzim alkalmazásával is végrehajthatók. Példaként említhető az 1b-genotípusba tartozó HCV-E1s-protein (2. azonosítószámú szekvencia), amely nem tartalmaz lizineket. A szóban forgó HCV-E1-proteineket tartalmazó proteinkivonat Lys-C endoproteinázzal (endo-Lys C) végzett emésztése 25 során az E1-proteinek nem bomlanak le, miközben az egy vagy több lizint tartalmazó szennyező proteinek lebontása bekövetkezik. Az ilyen eljárás jelentős mértékben egyszerűsíti, illetve javítja a HCV-E1-proteinek izolálását és/vagy tisztítását. Ezen túlmenően, a pre-proteinbe további lizin beiktatása (például, a vezetőpeptid és a HCV-E1-protein közé) előnyös lehetőséget biztosít a vezetőpeptid HCV-E1 pre-proteinről történő pontos *in vitro* leválasztására. Más 30 HCV-E1-proteinek a 4., 40., 42., 44., 61., 65. vagy 179. pozíciókban (ahol az aminosavak számozása az E1-protein természetes N-terminális aminosavával kezdjük, azaz a HCV-poliprotein 192. pozíciójánál). Az endo-Lys C alkalmazhatóságának elősegítése céljából a lizineket más aminosavval (előnyösen argininnel) helyettesíthetjük.



szekvencia vagy egy érési hely részét képezheti, továbbá. Ezenfelül, az adapterpeptid olyan komponensként is funkcionálhat, amely javítja vagy elősegíti a protein (amelynek része az adapterpeptid) detektálását és/vagy tisztítását és/vagy érését. Az adapterpeptidek egyik példája a His-toldalékpeptid (HHHHHH; 63. azonosítószámú szekvencia), amely rendszerint hat hisztidinből áll, de tartalmazhat 7, 8, 9, 10, 11 vagy 12 hisztidint is. Az adapterpeptidek további példái közé tartozik az EEGEPK (ld. a WO 98/28429 számú nemzetközi közzétételi iratot; 64. azonosítószámú szekvencia) és az EEAEPK peptid (ld. a WO 97/22706 számú nemzetközi közzétételi iratot; 65. azonosítószámú szekvencia), amelyről leírták, hogy a szóban forgó protein N-terminálisán elhelyezkedve fokozza a fermentációs hozamot, ugyanakkor, a protein N-terminális végét megvédi a dipeptidil aminopeptidáz hatásával szemben, ezáltal a polipeptid homogén N-terminálisát eredményezi. A szóban forgó protein *in vitro* érési folyamata [azaz az említett EEGEPK (64. azonosítószámú szekvencia) és EEAEPK peptid (65. azonosítószámú szekvencia) lehasítása], például, endo-Lys C alkalmazásával hajtható végre, amely e peptidekben a lizintől C-terminális irányban hasít. Ilyenformán, e peptidek adapterpeptidként (A) és érési („processing”) helyként (PS) egyaránt funkcionálnak (ld. később). Az adapterpeptidek szekvenciáit a 63-65, 70-72. és 74-82. azonosítószámú szekvenciákként mutatjuk be. Az adapterpeptidek egy másik példája a G4S immunológiailag néma („immunosilent”) kapcsolópeptid. Az adapterpeptidek további példáit Stevens és mtsai. (2000) cikkének 2. táblázatában sorolják fel.

Az érési („processing”) hely (PS) specifikus protein érési helyet jelent. Az érési folyamat enzimatis vagy kémiai úton játszódhat le. A specifikus enzimatis hasításra fogékony érési helyek példái közé tartoznak a következők: IEGR↓X (66. azonosítószámú szekvencia), IDGR↓X (67. azonosítószámú szekvencia) és az AEGR↓X (68. azonosítószámú szekvencia), melyeket a szarvasmarha-eredetű Xa-faktor proteáz az Arg és Xaa (tetszőleges aminosav) között ismer fel és hasít („↓”) [ld. Nagai és Thogersen (1984)]. Az érési helyek egy másik példajaként kétbázisos hely (pl. Arg-Arg, Lys-Lys, Arg-Lys vagy Lys-Arg) említhető, amely Kex2-proteázzal hasítható [ld. Julius és mtsai. (1984)]. A PS-hely egybázisos Lys-hely is lehet, amely egy A-peptid C-terminálisán helyezkedhet el. A C-terminális egybázisos Lys-PS-helyet tartalmazó adapter (A-)peptidek példái a 64., 65. és 74-76. azonosítószámú szekvenciákat tartalmazó peptidek. A His-toldalék (HHHHHH; 63. azonosítószámú szekvencia) exoproteolitikus eltávolítása a dipeptidil aminopeptidáz-I (DAPáz) önmagában vagy glutamin ciklotranszferázzal (Q-cikláz) vagy piroglutaminsav aminopeptidázzal (pGAPáz) együttes al-

kalmazásával hajtható végre [Pedersen és mtsai. (1999)]. Az ilyen – a reakcióelegyből a peptidáz fémaffinitási immobilizációs kromatográfiával (IMAC) történő eltávolítását elősegítő rekombináns His-toldalékot tartalmazó - exopeptidázok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők [pl. a TAGZyme System, amely az Unizyme Laboratories (Hørsholm, Dánia) terméke].

5 Ilyenformán, az „érés” kifejezésen, általánosan, olyan módszert vagy eljárást értünk, amellyel egy protein legalább egy érési helyen specifikusan hasítható, ha az érési hely jelen van a proteinben. Az érési helyek endoproteolitikus hasításra vagy exoproteolitikus hasításra lehetnek fogékonyak, mely hasítás mindkét esetben specifikus, azaz nem terjed túl a proteolitikus enzim által felismert helyeken. A 66-68., 83. és 84. azonosítószámú szekvenciákban számos PS-  
10 helyet adunk meg.

A fentiekben tárgyalt  $[(A1/3)_{a/d}-(PS1/2)_{b/e}-(A2/4)_{c/f}]$  struktúra sokoldalúságát néhány példával szemléltetjük. Az első példában a fenti struktúra egy pre-protein részét képező HCV-burokprotein C-terminális végén helyezkedik el, és A3 jelentése: VIEGR peptid (69. azonosítószámú szekvencia), amely átfedő a Xa-faktor által felismert „IEGRX” PS-hellyel (66. azonosítószámú szekvencia), amelyben X = A4, a hisztidin-toldalék (63. azonosítószámú szekvencia), és így „d”, „e” és „f” értéke egyformán 1. A szóban forgó HCV-protein, adott esetben, IMAC-kromatográfiával tisztítható. A Xa-faktossal végzett hasítást követően az (adott esetben tisztított) HCV-protein C-terminális végén érett PS-helyet („IEGR”; 70. azonosítószámú szekvencia) tartalmaz, melyen változatai az IDGR (71. azonosítószámú szekvencia) és az AEGR  
20 (72. azonosítószámú szekvencia). Egy másik példa szerint az  $[(A1/3)_{a/d}-(PS1/2)_{b/e}-(A2/4)_{c/f}]$  struktúra a HCV-burokprotein N-terminálisán helyezkedik el, és A1 a hisztidin-toldalék (63. azonosítószámú szekvencia), PS a Xa-faktor felismerési helye (66. 67. vagy 68. azonosítószámú szekvencia), ahol X jelentése: a kérdéses protein, és  $a=b=1$  és  $c=0$ . A vezetőpeptid (pl. gazdasejt általi) pontos eltávolítását követően a kapott HCV-burokprotein, adott esetben,  
25 IMAC-kromatográfiával tisztítható. A Xa-faktossal végzett hasítást követően a szóban forgó proteinről hiányzik az  $[(A1)_a-(PS1)_b-(A2)_c]$  struktúra,

Az A1, A2, A3, A4, PS1 és PS2 komponensek bármelyike ismétlődő struktúraként is jelen lehet. Ebben az összefüggésben, az ilyen ismétlődő struktúra, ha jelen van, továbbra is egynek számítható, azaz a, b, c, d, e vagy f értéke akkor is 1, ha például A1 két ismétléssel  
30 (A1-A1) fordul elő.

A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti izolált HCV-burokproteinekben vagy fragmenseikben a ciszteinek tiolcsoportja kémiai úton módosítva van.

A találmány egy további megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti izolált HCV-burokproteinek vagy fragmenseik antigénhatásúak.

A találmány egy további megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti izolált HCV-burokproteinek vagy fragmenseik immunogén tulajdonságúak.

5 A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti izolált HCV-burokproteinek vagy fragmenseik T-sejt-stimuláló epitópot tartalmaznak.

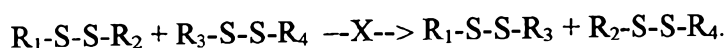
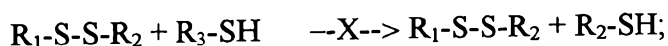
A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti izolált HCV-burokproteinek vagy fragmenseik monomerek, homodimerek, heterodimerek, homo-oligomerek vagy hetero-oligomerek.

10 A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti izolált HCV-burokproteinek vagy fragmenseik vírusszerű részecskében helyezkednek el.

A találmány szerinti HCV-burokproteinek vagy részleteik legalább egy, de előnyösen két vagy több ciszteint tartalmaznak, amely ciszteinek tiolcsoportjai irreverzibilisen kémiai vagy enzimatisz módsszerekkel védhetők. A kémiai módsszerrel végzett „irreverzibilis védés” vagy „irreverzibilis blokkolás” kifejezésen alkilezészt, előnyösen a HCV-burokproteinek alkilezősszer [például, aktív halogénvegyületek, etilénimin vagy N-(jód-etil)-trifluor-acetamid] alkalmazásával végzett alkilezészt értjük. Az alkilezészt azt jelenti, hogy a cisztein tiolcsoportjában a tiolhidrogént (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>R- csoporttal helyettesítjük [ahol „n” értéke: 0, 1, 2, 3 vagy 4; R jelentése: hidrogénatom, karboxilcsoport (-COOH), -NH<sub>2</sub> csoport, -CONH<sub>2</sub> csoport, fenilcsoport vagy ezek származékai]. Az alkilezészt bármely ismert eljárással végrehajtható, például, aktív halogénvegyületek [X(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>R; ahol X jelentése: halogénatom, pl. jód, bróm, klór vagy fluoratom] alkalmazásával. Az aktív halogénvegyületek példái között említhető a metiljodid, jódacetsav, jódacetamid és 2-bróm-etilamin. Az alkilezészt alkalmas további módsszerek közé tartozik az N-etilmaleimid (NEM) vagy Biotin-NEM (vagy ezek elegye) alkalmazásával végzett eljárás és az etilénimin vagy N-(jód-etil)-trifluoracetamid alkalmazásával végzett eljárás, melyek a hidrogénatom -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> csoporttal történő helyettesítészt eredményezik [ld. Hermanson (1996)]. Ahogy itt használjuk, az „alkilezősszer” kifejezésen olyan vegyületeket értünk, amelyek alkalmasak a fentebb leírt alkilezészi reakció végrehajtására. Az alkilezészt, végső soron, módosított ciszteint eredményez, amely más aminosavak viselkedését utánozhatja. Például, az etiléniminnel végzett alkilezészt lizinre emlékeztető szerkezetet eredményez, miáltal a tripszin számára új hasítási hely kerül beépítésre [ld. Hermanson (1996)]. Hasonlóan, a metiljodid alkalmazása metioninra emlékeztető aminosavat eredményez, míg a jódacetát vagy jódacetamid felhasználásával végzett alkilezészt eredményeként glutaminsavra, illetve glutaminra

emlékeztető aminosavat kapunk. Ennek mintájára, ezeket az aminosavakat előnyösen a cisztein közvetlen mutációjaként alkalmazzuk. Mindezek alapján, a találmány tárgyát a fentebb leírt HCV-burokproteinek képezik, melyekben a HCV-burokprotein legalább egy ciszteinje mutációval természetes aminosavval - előnyösen metioninnal, glutaminsavval, glutaminnal vagy lizinnel - van helyettesítve. A „mutáción” az ezen aminosavakat kódoló nukleinsavak helyspecifikus mutagenézisét értjük, azaz olyan, szakember számára jól ismert eljárást, mint például, a polimeráz láncreakcióval végzett helyspecifikus mutagenézis vagy az oligonukleotid-közvetítette mutagenézis [ld. Sambrook és mtsai. (1989)]. A későbbiekben bemutatásra kerülő példákban az alkilezésen, hacsak másképpen nem jelezzük, az alkilezőszerként jód-acetamid alkalmazásával végzett alkilezést értjük.

Tudni kell továbbá, hogy a tisztítási eljárás során a találmány szerinti HCV-burokproteinek vagy részleteik cisztein tiolcsoportjai reverzibilisen védhetők. A reverzibilis védelem célja a HCV-protein vagy részlete stabilizálása. A reverzibilis védelem eredményeként különösen a kéntartalmú funkciós csoportok (pl. tiolok és diszulfidok) reaktivitása kerül blokkolásra, miáltal a kéntartalmú funkciós csoport nem képes más vegyületekkel reakcióba lépni, azaz nem képeznek diszulfidkötések kialakítására vagy kicserélésére. Például:



A fenti, tiolok és/vagy diszulfidgyökök közötti reakciók nem csak intermolekuláris folyamatok lehetnek, hanem molekulák között is lejátszódhatnak.

Ahogy itt használjuk, a „reverzibilis védelem” vagy „reverzibilis blokkolás” kifejezéseken a cisztein tiolcsoportjához modifikáló ágensek kovalens kapcsolását, valamint a HCV-protein környezetének oly módon történő manipulálását értjük, hogy a cisztein tiolcsoportok redox-állapota a tisztítási eljárás további lépései során változatlanok maradjanak (árnyékolás). A cisztein tiolcsoportok reverzibilis védelem kémiai vagy enzimatisz módszerekkel hajtható végre.

Ahogy itt használjuk, az „enzimatisz módon végrehajtott reverzibilis védelem” kifejezés enzimek [mint például, aciltranszferázok, pl. tio-észterezés katalizálásában szerepet játszó aciltranszferázok, mint pl. a palmitoil aciltranszferáz (ld. később)] által közvetített reverzibilis védelemre vonatkozik.

A „kémiai módszerekkel végrehajtott reverzibilis védés” kifejezés a következő pontok szerinti reverzibilis védésre vonatkozik:

- 1) A ciszteinelgyökök reverzibilis módosítását eredményező modifikáló reagensekkel végzett védés (pl. szulfonálással vagy tio-észterezésével). A szulfonálási reakció során a diszulfidhidakat alkotó tiolok vagy ciszteineket S-szulfonáttá alakulnak:  $RSH \rightarrow RS-SO_3^-$  [Darbre (1986)]  
 5 vagy  $RS-SR \rightarrow 2 RS-SO_3^-$  [szulfitolízis; Kumar és mtsai. (1986)]. A szulfonálásra alkalmas reagensek például a  $Na_2SO_3$  és a nátrium-tetratió. E reagenseket 10-200 mM koncentrációban, előnyösebben 50-200 mM koncentrációban alkalmazzuk. A szulfonálás, adott esetben, katalizátor (pl. 100  $\mu M$  – 1 mM koncentráció-tartományban alkalmazott  $Cu^{2+}$  vagy 1-10 mM kon-  
 10 centrációban alkalmazott cisztein] jelenlétében végezhető.

A reakciót proteint denaturáló, illetve natív feltételek mellett egyaránt végrehajthatjuk [Kumar és mtsai. (1985) és (1986)].

A tioészter-kötés kialakulása, illetve a tioészterezés a következő reakcióval írható le:



- 15 ahol X jelentése, előnyösen, halogenid, az  $R'CO-X$  vegyületben.

- 2) A találmány szerinti ciszteinelgyököket reverzibilisen módosító modifikáló reagensekkel végzett védés, például, nehézfémionokkal [pl.  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ , mono-, ditio- és diszulfidvegyületek (pl. aril- és alkil-metán-tioszulfonát, ditiopiridin, ditiomorfolin, dihidrolipoamid, Ellmann-reagens, Aldrothiol™ (Aldrich) [Rein és mtsai. (1996)], ditiokarbamátok] vagy tioláló reagen-  
 20 sekkel (pl. glutation, N-acetil-cisztein, ciszteinamin). A ditiokarbamátok az  $R_1R_2NC(S)SR_3$  funkciós csoportot tartalmazó molekulák népes osztályát alkotják, mely funkciós csoport lehetővé teszi a szulfhidrilcsoporttal bekövetkező reakciót. A tioltartalmú vegyületeket előnyösen 0,1-50 mM, előnyösebben 1-50 mM koncentrációban, még előnyösebben 10-50 mM kon-  
 centrációban alkalmazzuk.

- 25 3) A tiol állapotot megőrző (stabilizáló) modifikáló reagensek [elsősorban antioxidánsok, például, DTT, dihidroaszcorbinsav, vitaminok és származékaik, mannitol, aminosavak, peptidek és származékaik (pl. hisztidin, ergotionein, carnozin, metionin), gallátok, hidroxianizol, hidroxitoluol, hidrokinon, hidroxi-metilfenol és származékaik] jelenlétében (10  $\mu M$  és 10 mM, előnyösebben 1-10 mM koncentráció-tartományban) végzett reverzibilis védés.

- 30 4) Tiolstabilizáló feltételek mellett végzett reverzibilis védés, például (i) kofaktorok, mint például, fémionok ( $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) vagy ATP jelenlétében; (ii) pH-szabályozás mellett (például, pro-

teineknel a legtöbb esetben pH ~5, vagy a pH előnyösen tiol  $pK_a$ -ja ~2; pl., reverz fázisú kromatográfiával ~2-es pH-n tisztított peptidek esetében).

A fenti, (1)-(4) pontokban leírt reverzibilis védési módszerek kombinálása hasonlóan tiszta és újrarahajtogatódott HCV-proteineket eredményez. Valójában, a vegyületek kombinálásáról van szó, mint például, a Z103 (Zn-carnozin), előnyösen 1-10 mM koncentrációban történő alkalmazásáról. Kézenfekvő, hogy a reverzibilis védecs – a módosító csoportok vagy árnyékolás mellett – mindazon ciszteinil-védési eljárásokkal is megvalósítható, amelyek enzimatis vagy kémiai úton (a peptidváz károsítása nélkül) visszafordíthatók. E vonatkozásban, a találmány szerinti megoldás értelmében, elsősorban a klasszikus kémiai szintézissel előállított peptidek említhetők (ld. fentebb), melyek során, például, a tioészter-kötéseket tioészterázzal, bázikus kémhatás alkalmazásával [Beekman és mtsai. (1997)] vagy hidroxilaminos kezeléssel [Vingerhoeds és mtsai. (1996)] hasítjuk.

A tioltartalmú HCV-proteinek, például, olyan affinitási kromatográfiás gyantán tisztíthatók, amelyek (1) diszulfidkötést tartalmazó, hasítható kapcsolókat tartalmaznak [pl. immobilizált 5,5'-ditio-bisz(2-nitro-benzoészav); ld. Jayabaskaran és mtsai. (1987) és aktivált tiol-Sepharose 4B (Pharmacia) oszlopon végzett kovalens kromatográfia]; vagy (2) immobilizált ligandumként amino-hexanoil-4-amino-fenil-arzint tartalmaznak. Ez utóbbi affinitási mátrix olyan proteinek tisztítására alkalmazható, amelyek redox-szabályozás alatt állnak, illetve olyan ditiol-proteinekére, amelyek oxidatív stressz célpontjai [Kalef és mtsai. (1993)].

A reverzibilis védecs felhasználható a peptidek szolubilizálásának és extrahálásának javítására is [Pomroy és Deber (1998)].

A reverzibilis védésre alkalmas és a tiolstabilizáló vegyületek monomerként, polimerként vagy liposzómák alakjában prezentálhatók.

A ciszteinek reverzibilis védettségi állapota kémiai vagy enzimatis úton, a következők szerint szüntethető meg:

- redukálószer (például, DTT, DTE, 2-merkaptóetanol, ditionit,  $SnCl_2$ , nátrium-bór-hidrid, hidroxilamin, TCEP) 1-200 mM, előnyösebben 50-200 mM koncentrációban történő alkalmazásával;

- a tiolstabilizáló feltételek vagy reagensek megszüntetésével (eltávolításával), például, a pH növelésével;

- enzimek (elsősorban tioészterázok, glutaredoxin, tioredoxin) 0,01-5  $\mu M$ , előnyösebben 0,1-5  $\mu M$  koncentrációban történő alkalmazásával; valamint

- a fenti kémiai és/vagy enzimatis módszerek kombinálásával.

A ciszteinek reverzibilis védettségeinek megszüntetése *in vitro* vagy *in vivo*, sejten vagy személyben valósítható meg.

A tisztítási eljárásban a ciszteinek irreverzibilisen blokkolása szabadon választható, csakúgy, mint a reverzibilis modifikáló reagensekkel végzett helyettesítés.

- 5 A találmány értelmében a redukálószer olyan reagens, amely a ciszteinekben lévő kénatom (pl. „S-S” diszulfid-híd) redukálását, a cisztein deszulfonálását ( $\text{RS-SO}_3^- \rightarrow \text{RSH}$ ) eredményezi. Az antioxidánsok a tiol-állapotot fenntartó, illetve a diszulfidhidak képződését és/vagy a diszulfid-kicserélődést minimálisra csökkentő reagensek. A diszulfidhidak redukciója olyan kémiai reakció, melynek eredményeként a diszulfidok tiollá (-SH) redukálódnak. A diszulfidhidakat felbontó reagensek és eljárások leírását illetően ld. a WO 96/04385 számú nemzetközi közzétételi iratot (Maertens és mtsai.), melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének kell tekinteni. A diszulfidkötés redukciója (1) enzimatisz kaszkád reakcióutak révén vagy (2) redukáló vegyületek alkalmazásával hajtható végre. A diszulfidok *in vivo* redukálásában olyan enzimek játszanak szerepet, mint a tioredoxin és glutaredoxin, melyekről bebizonyosodott, hogy
- 10 a diszulfidhidak *in vitro* redukálására is hasznosak. A redukált tioredoxin 7,0-es pH-n gyorsan hasítja a diszulfidkötéseket, mely reakció sebessége látszólagos másodrendű, amely kb.  $10^4$ -szerese a DTT-vel bekövetkező reakció sebességi állandójának. A redukció kinetikája nagymértékben növelhető, ha a proteinoldatot előzetesen 1 mM DTT-vel vagy dihidrolipoamiddal inkubáljuk [Holmgren (1979)]. A proteinek diszulfidhídjainak redukálására képes tiolvegyületek példáulként említhető a ditiotreitol (DTT), ditioeritritol (DTE),  $\beta$ -merkaptóetanol, tiokarbamatok, bisz(2-merkaptó-etil)-szulfon és N,N'-bisz(merkaptó-acetil)-hidrazin és nátrium-ditio-
- 20 nit. A tiolcsoportok nélküli redukálószerrek, mint az aszkorbinsav és ón(II)-klorid ( $\text{SnCl}_2$ ), melyek nagyon hasznosnak bizonyultak a monoklonális antitestekben lévő diszulfidhidak redukálására [ld. Thakur és mtsai. (1991)], szintén alkalmasak a HCV-proteinek redukálására. Ezen túlmenően, a pH-értékben bekövetkező változások szintén befolyásolhatják a HCV-proteinek redox-státuszát. Kimutatták, hogy nátrium-bór-hidrides kezeléssel hatásosan redukálhatók a peptidek diszulfidkötései [ld. Gailit (1993)]. Alacsony pH-n a trisz(2-karboxi-etil)-foszfín (TCEP) szintén képes a diszulfidok redukálására [Burns és mtsai. (1991)]. Redukálószerként DTT vagy nátrium-bór-hidrid alkalmazása esetén a szelenol katalizálja a diszulfid tiolokká történő redukcióját. E katalizátor prekursoraként szelenociszteamint (amely kereskedelmi forgalomban beszerezhető diszelenid) alkalmaztak [ld. Singh és Kats (1995)].
- 30

Az „immunogén” kifejezés egy protein vagy anyag immunreakciót kiváltó képességére vonatkozik. Az immunreakción a szervezet antigén behatolására adott összes reakcióját értjük,

ideértve az antitestek képződését, a celluláris immunitást, hiperszenzitivitást, illetve az immunológiai toleranciát. A celluláris immunitás T-„helper”-sejtes és/vagy CTL-reakcióra vonatkozik.

5 Az „antigénhatású” kifejezésen egy protein vagy anyag antitest-termelődést okozó vagy celluláris reakciót kiváltó képességét értjük.

A találmány értelmében a „T-sejt-stimuláló epitóp” kifejezésen T-sejtek, illetve CTL-sejtek stimulálására képes epitópot értünk. A T-„helper”-sejtet stimuláló epitópok az olyan polipeptidekkel szembeni limfoproliferatív reakció kimutatásával tesztelhetők, amelyek aminosav-szekvenciájukban (feltételezett) T-sejt-stimuláló epitópot tartalmaznak. Az ilyen  
10 limfoproliferatív reakció T-„helper” tesztel mérhető, melynek során egy páciens szérumból származó perifériás egymagvú vérsejteket (PBMC-sejtek) a T-sejt-stimuláló aktivitásra tesztelni kívánt peptidek különböző koncentrációival *in vitro* stimuláljuk, és mérjük a radioaktív izotóppal jelölt timidin sejtek általi felvételét. A CTL-stimuláló epitópok citotoxikus T-sejt (CTL) teszt alkalmazásával szelektálhatók, amellyel a citotoxikus sejtek litikus aktivitását <sup>51</sup>Cr-izotóp  
15 felszabadulása alapján mérjük. A proliferációt pozitívnak tekintjük, ha a stimulációs index (az antigénnel stimulált tenyészetek átlagos cpm-értéke/kontroll tenyészetek átlagos cpm-értéke) egynél nagyobb (előnyösen nagyobb, mint kettő, legelőnyösebben nagyobb, mint három).

A találmány egy következő szempontjának megfelelően, feltárunk egy készítményt, amely találmány szerinti, izolált HCV-burokproteint vagy annak fragmensét tartalmazza. A ta-  
20 lálmány szerinti készítmény gyógyászati szempontból elfogadható hordozót is tartalmazhat, és gyógyszerként vagy vakcinaként prezentálható.

A találmány egy további megvalósítási módja értelmében olyan gyógyszert vagy vakcinát tárunk fel, amely találmány szerinti HCV-burokproteint vagy annak részletét tartalmazza.

A találmány egy következő megvalósítási módja szerint gyógyászati készítményt tá-  
25 runk fel HCV-specifikus immunreakció emlősbén történő indukálására, mely készítmény találmány szerinti HCV-burokprotein vagy részlete hatásos mennyiségét, és – adott esetben - gyógyászati szempontból elfogadható adjuvánst tartalmaz. A találmány szerinti HCV-burokprotein vagy részlete hatásos mennyiségét tartalmazó gyógyászati készítmény alkalmas lehet HCV-specifikus antitestek kialakulásának emlősbén történő indukálására vagy T-sejt-funkció em-  
30 lősbén történő indukálására. A találmány szerinti HCV-burokprotein vagy részlete hatásos mennyiségét tartalmazó gyógyászati készítmény profilaktikus készítmény vagy terápiás készítmény lehet. Az egyik konkrét megvalósítási mód értelmében a szóban forgó készítmény emberekben alkalmazható.

Az „emlős” kifejezésen a gerincesek törzsének emlősök osztályába tartozó fajokat értünk (ideértve az embert is), melyek alapvető jellemzői az elevenszülés, a testszőrzet és a nőtény egyedek (fiatal egyedek táplálására szolgáló) tejelválasztásra alkalmas emlőmirigye. Ennek megfelelően, az emlősök közé tartoznak a nem humán főemlősök és a háromízes („trimera”) egerek [Zauberman és mtsai. (1999)].

Ahogy itt használjuk, a „vakcina” vagy „gyógyszer” kifejezésen betegséggel szembeni részleges vagy teljes védekezés kiváltására képes készítményt értünk, függetlenül a betegség akut vagy krónikus természetétől – ebben az esetben a vakcina vagy gyógyszer profilaktikus vakcina vagy gyógyszer. A találmány szerinti vakcina vagy gyógyszer már megbetegedett személy kezelésére is hasznos lehet – ebben az esetben terápiás célú vakcináról vagy gyógyszerrel beszélünk. Hasonlóan, a gyógyászati készítmények profilaktikus és/vagy terápiás célokra is alkalmazhatók, mely esetben profilaktikus és/vagy terápiás készítményekről van szó.

A találmány szerinti HCV-burokproteinek önmagukban, biotinilált alakban (részletes leírást illetően ld. a WO 93/18054 számú nemzetközi közzétételi iratot) és/vagy Neutralite Avidin-nel (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), avidinnel vagy sztreptavidinnel komplexálva alkalmazhatók. Megjegyezzük továbbá, hogy a „vakcina” vagy „gyógyszer”, az aktív komponensen kívül, „gyógyászati szempontból elfogadható hordozót” vagy „gyógyászati szempontból elfogadható adjuvánst” is tartalmazhat, amely segédanyagként, diluendumként, hordozóként és/vagy adjuvánsként funkcionálhat, és önmagában nem indukálja a készítménnyel kezelt személyre káros antitest termelődését, illetve nem indukál védettséget. Az ilyen célra alkalmas hordozók általában nagyméretű, lassan metabolizálódó makromolekulák (például, proteinek, poliszacharidok, politejsavak, poliglikolsavak, polimer aminosavak, aminosav-kopolimerek és inaktív vírusrészecskék. Az ilyen hordozók szakember számára jól ismertek. A találmány szerinti készítmény hatékonyságát serkentő adjuvánssok előnyös példái közé tartoznak, többek között, a következők: alumínium-hidroxid; alumínium és 3-O-deacilezett monofoszforil-lipid-A kombinációja (WO 93/19780 számú nemzetközi közzétételi irat); alumínium-foszfát (ld. WO 93/24148 számú nemzetközi közzétételi irat); N-acetil-muramil-L-treonil-D-izoglutamin (ld. a 4 606 918 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást); N-acetil-normuramil-L-alanil-D-izoglutamin; N-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutamin-L-alanin-2-(1',2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-foszforil-oxi)-etilamin; RIBI (ImmunoChem Research Inc., Hamilton, MT, USA), amely 2 % szkvalén/Tween-80 emulzióban monofoszforil-lipid-A-t, detoxikált endotoxint, trehalóz-6,6-dimikolátot és sejtfal-skeletont (MPL + TDM + CWS) tartalmaz. Ez utóbbi adjuvánskészítmény mindhárom komponense alkalmazható önmagában vagy kettesével

alkotott kombinációkban is. Az MPL szintetikus analógjával (RC-529) is helyettesíthető. A fentiekén túlmenően, alkalmazhatók egyéb adjuvánsok is, mint például a Stimulon (Cambridge Bioscience, Worcester, MA, USA), SAF-1 (Syntex), illetve bakteriális DNS-alapú adjuvánsok, mint az ISS (Dynawax) vagy a CpG (Coley Pharmaceuticals), továbbá a QS21 és a 3-de-O-acetilált monofoszforsil-lipid-A (WO 94/00153 számú nemzetközi közzétételi irat) vagy az MF-59 (Chiron) kombinációja; a poli[di(karboxilát-fenoxi)-foszfazén]-alapú adjuvánsok (Virus Research Institute); blokk-kopolimer-alapú adjuvánsok, mint pl. az Optivax (Vaxcel, Cythx); inulinalapú adjuvánsok, mint pl. az Algammulin és GammaInulin (Anutech); nem komplett Freund-féle adjuváns (IFA); valamint a Gerbu-készítmények (Gerbu Biotechnik). Tudni kell továbbá, hogy a Freund-féle komplett adjuváns (CFA) nem humán alkalmazásokban és kutatási célokra egyaránt felhasználható. A találmány szerinti „vakcinakészítmény” segédanyagokat és diluendumokat is tartalmazhat, melyek nem toxikusak és nincs terápiás hatásuk, mint például, a víz, sóoldat, glicerín, etanol, nedvesítőanyagok, emulgeálószer, pufferek, tartósítószer és hasonló. A vakcinakészítményt jellemzően injektálható alakban (folyékony oldatként vagy szuszpenzióként) állítjuk elő. A vakcinakészítmény szubkután, intramuszkulárisan, intravénásan, intraperitoneálisan, ízületi üregbe vagy intradermálisan injektálható. További adagolási típusokként említhető az implantáció, végbélkúpok alkalmazása, szájon át történő adagolás, enterikus adagolás, inhalálás, továbbá aeroszolok, orr-sprayk és orrcseppek alkalmazása. Készíthetők szilárd dóziszalakok is, amelyek az injektálás előtt folyékony hordozóban oldhatók vagy szuszpendálhatók. A készítmény – az adjuváns hatás erősítése céljából – emulgeálható vagy liposzómákba foglalható. A polipeptidek szaponinokkal (pl. Quil-A-val) együtt ún. immunstimuláló komplexekbe (ISCOM) foglalható. A vakcinakészítmények egy aktív anyag hatásos mennyiségét a fenti komponensek bármelyikével kombinálva tartalmazhatják. Az aktív anyag „hatásos mennyisége” kifejezésen azt értjük, hogy az adott mennyiség páciensnek történő beadása (akár egy dózisban, akár dózissorozat részeként) hatásos egy betegség megelőzésére vagy kezelésére, illetve a kívánt hatás indukálására. Ez a mennyiség a kezelt egyed egészségi és fizikai állapotától, rendszertani besorolásától (pl. ember, nem humán főemlős, főemlős, stb.), az egyed immunrendszerének hatásos immunreakciót indító képességétől, az elérni kívánt védetség mértékétől, a vakcina kialakításától, a kezelőorvos saját megítélésétől, a fertőző patogén törzsétől és egyéb, releváns faktoroktól függ. A hatásos mennyiség rutinszerű kísérletekkel megállapítható, viszonylag széles tartományba esik – rendszerint 0,01-1000 µg/dózis, előnyösebben 0,1-100 µg/dózis tartományba. Az adagolást egy dózisos vagy több dózisos sé-

ma szerint végezhetjük. A vakcinát egyéb immunszabályozó hatóanyagokkal együttesen is adagolhatjuk.

A találmány egy további szempontjának megfelelően, eljárást tárunk fel találmány szerinti izolált HCV-burokprotein vagy fragmense előállítására.

5 A találmány szerinti előállítási eljárás során, például, az említett HCV-burokproteint vagy részletét kódoló nyitott leolvasási fázist tartalmazó rekombináns nukleinsavval vagy vektorral olyan gazdasejtet transzformálunk, amely képes a szóban forgó HCV-burokprotein vagy részlete expresszáására. A találmány szerinti eljárás, további lépésként, magában foglalhatja a gazdasejtek megfelelő tápközegben - találmány szerinti protein expresszálatása érdekében -  
10 végzett tenyésztését, továbbá a termelt protein gazdasejtek tenyészetéből (vagy magukból a gazdasejtekből) történő izolálását. Az izolálás a következők lépések közül egy vagy több alkalmazásával hajtható végre: (i) a gazdasejtek feltárása chaotrop reagens jelenlétében; (ii) az izolált proteinekben lévő ciszteinek tiolcsoportjainak – reverzibilis vagy irreverzibilis - kémia módosítása; és (iii) heparin-affinitási kromatográfia.

15 A „chaotrop reagens” jellemző példáiként a guanidinium-klorid és a karbamid említhető. A chaotrop reagens általában olyan vegyszer, amely képes a víz hidrogénkötési struktúrájának felbontására. Tömény oldatokban ezek képesek a proteinek denaturálására, mivel csökkentik a hidrofób hatást.

A „rekombináns nukleinsav” kifejezésen természetes vagy szintetikus nukleinsavat  
20 értünk, amely legalább egy rekombináns DNS-technikával végzett módosításon esett át (például, restriktációs enzimikus emésztés, polimeráz láncreakció, ligálás, defoszforiláció, foszforiláció, mutagenézis, kodonok heterológ sejtekben történő expresszálatás céljából végzett adaptálása, stb.). A rekombináns nukleinsav általában természetben előforduló nukleinsav fragmense vagy legalább két – természetes állapotban egymással nem összefüggő – nukleinsavat tartalmaz  
25 (vagy teljes egészében szintetikus nukleinsav).

Ahogy a leírásban használjuk, a „polinukleotid”, „polinukleinsav”, „nukleinsav-szekvencia”, „nukleotidszekvencia”, „nukleinsav-molekula”, „oligonukleotid”, „próba” vagy „lánc-indító” kifejezéseken nukleotidok (ribonukleotidok, dezoxiribonukleotidok, peptid-nukleotidok, zárt („locked”) nukleotidok vagy kombinációik) tetszőleges hosszúságú és tetszőleges  
30 alakú (pl. elágazó láncú) polimer alakjait értjük. E kifejezések jelentése kiterjed a kettős szálú és egyszeres szálú polinukleotidokra, valamint a háromszoros szálú polinukleotidokra. Ezen túlmenően, az említett kifejezések magukban foglalják az ismert nukleotid-módosításokat, például, a metilálást, gyűrűvé zárást és az ún. „cap” (sapka) módosításokat, valamint egy vagy

több természetes nukleotid analógokkal [pl. inozinnal vagy nem amplifikálható monomerekkel, mint pl. hexetilén-glikollal (HEG)] történő helyettesítését. A ribonukleotidok rövidítése: NTP, a dezoxiribonukleotidoké: dNTP, míg a didezoxiribonukleotidoké: ddNTP.

A nukleotidok radioaktív izotópokkal, kemilumineszcens anyagokkal, fluoreszcens anyagokkal, foszforeszcens anyagokkal, illetve infravörös színezékekkel vagy felületi erősítésű Raman-jelölővel vagy plazmon-rezonáns részecskével (PRP) jelölhetők.

Az említett kifejezések („polinukleotid”, „polinukleinsav”, „nukleinsav-szekvencia”, „nukleotidszekvencia”, „nukleinsav-molekula”, „oligonukleotid”, „próba” vagy „láncindító”) jelentése ugyancsak kiterjed a peptid-nukleinsavakra (PNS-ekre), amelyek olyan DNS-analógok, melyek molekulavázát - cukoregységek helyett - N-(2-amino-etil)-glicin egységekből álló pszeudopeptid alkotja. A PNS-ek utánozzák a DNS viselkedését, és komplementer nukleinsav-szállhoz kötődnek. A PNS semleges molekulaváza a normálisnál erősebb kötődést és nagyobb specifitást eredményez. Ezen túlmenően, a PNS-ek egyedülálló kémiai, fizikai és biológiai tulajdonságait hatékony biomolekuláris eszközök, antiszensz és antigén ágensek, molekuláris próbák és bioszenzorok létrehozására hasznosították. A PNS-próbák általában rövidebbek a DNS-próbáknál: általában 6-20 bázis, optimálisan 12-18 bázis hosszúságúak [ld. Nielsen (2001)]. A „polinukleotid” kifejezés és szinonimái jelentése az ún. zárt nukleinsavakra (LNS-ek) is kiterjed, amelyek olyan RNS-származékok, melyekben a ribózgyűrűt a 2'-oxigénatom és a 4'-szénatom közötti metilénkötés összeszűkíti. Az LNS-ek DNS- vagy RNS-célszekvenciákhoz példátlan affinitással kötődnek. Az LNS-nukleotidok oligomerizálhatók és kimérikus vagy kevert LNS/DNS vagy LNS/RNS molekulákba foglalhatók. Az LNS-ek tenyészetben tartott sejtekre nem bizonyultak toxikusnak [ld. Orum és Wengel (2001); Wahlestedt és mtsai. (2000)]. Általában idetartozónak tekintjük a DNS-ek, RNS-ek, PNS-ek és LNS-ek kiméráit vagy kevert molekuláit, illetve ezek bármelyikének olyan változatait, amelyekben timin helyett uracil szerepel.

Az eddigiek alapján kézenfekvő, hogy a találmány tárgyát képezik a találmány szerinti „core”-glikozilált HCV-burokproteinek vagy a találmány szerinti készítmények HCV-vakcinakészítmény előállítására történő alkalmazása is. Közelebbről, találmány szerinti „core”-glikozilált HCV-burokprotein alkalmazását tárjuk fel HCV elleni immunitás krónikus HCV-hordozóban történő indukálására. Az egyik konkrét megvalósítási mód értelmében találmány szerinti „core”-glikozilált HCV-burokprotein alkalmazását tárjuk fel HCV elleni immunitás krónikus HCV-hordozóban - más terápiát megelőzően, azzal egyidejűleg vagy azt követően - végzett indukálására, mely egyéb terápia, például, a jól ismert interferonos terápia lehet, amely

HCV kezelésére szolgáló kis molekulájú hatóanyagok (pl. ribavirin) adagolásával kombinálva vagy anélkül hajtható végre. A szóban forgó készítmény májátültetést megelőzően vagy azt követően - vagy feltételezett (pl. tűszúrás okozta) fertőzés után - is alkalmazható.

A találmány egy következő szempontjának megfelelően eljárást tárunk fel anti-HCV antitestek jelenlétének kimutatására feltételezhetően ilyen antitesteket tartalmazó mintában, melynek során

(i) egy találmány szerinti HCV-burokproteint vagy részletét - a HCV-burokprotein vagy részlete anti-HCV antitesttel történő komplexálódását elősegítő feltételek mellett - a mintával érintkeztetjük;

(ii) kimutatjuk az (i) lépésben kialakult komplexet; és

(iii) a detektálás eredményéből következtetünk az anti-HCV antitestek jelenlétére a mintában.

Ezen eljárás egy speciális megvalósítási módjában az (i) lépésben a protein vagy részlete mintával történő érintkeztetését kompetitív feltételek mellett végezzük. Egy másik megvalósítási mód szerint a HCV-burokproteint vagy részletét szilárd hordozóhoz kapcsolva alkalmazzuk. Egy további megvalósítási módban a feltételezhetően anti-HCV antitesteket tartalmazó mintaként biológiai mintát alkalmazunk.

A találmány egy további szempontjának megfelelően diagnosztikai készletet tárunk fel anti-HCV antitestek jelenlétének – feltételezhetően anti-HCV antitesteket tartalmazó – mintában történő kimutatására, mely készlet találmány szerinti HCV-burokproteint vagy annak részletét tartalmazza. Az egyik speciális megvalósítási mód szerint a készletben a HCV-burokprotein szilárd hordozóhoz van kapcsolva. Egy másik megvalósítási mód értelmében a feltételezhetően anti-HCV antitesteket tartalmazó mintaként biológiai mintát alkalmazunk.

Ahogy itt használjuk, a „biológiai minta” kifejezésen egy egyedből izolált szövetmintát vagy testfolyadék-mintát értünk, melyek példái, többek között, a következők: szérum, vérplazma, nyirok, bőrmetszetek, légzőrendszeri, emésztőrendszeri és húgy-ivarvezetési metszetek, petesejtek, könny, nyál, tej, vérsejtek, tumorok, szervek, gyomormetszetek, nyálka, gerincvelői folyadék, továbbá kiválasztott szekrétaumok, pl. ürülék, vizelet, sperma és hasonló.

A találmány szerinti HCV-burokproteinek vagy részleteik különösen alkalmasak a HCV detektálására és/vagy genotipizálására, HCV-okozta betegség prognosztizálására/ellenőrzésére szolgáló eljárásokban (pl. immuneszt eljárásokban) történő felhasználásra, illetve terápiás hatóanyagként történő alkalmazásra.

A találmány szerinti eljárásokban (pl. immuneszt eljárások) olyan, találmány szerinti HCV-burokproteineket alkalmazunk, amelyekben megmaradtak - a HCV-vel fertőzött egyedek szérumban jelen lévő - antitestek által felismert lineáris (peptidek esetében), illetve konformációs epitópok. A találmány szerinti HCV-E1- és HCV-E2-antigén gyakorlatilag bármely – az antitestek detektálására ismert antigént alkalmazó - tesztrendszerben felhasználható. Természetesen, a HCV konformációs epitópot denaturáló tesztelési feltételek nem alkalmasak, illetve megfelelő adaptálásra szorulnak. A szóban forgó tesztek közös jellemzője, hogy az antigént olyan feltételek mellett érintkeztetjük a - feltételezhetően anti-HCV antitestet tartalmazó – testkomponenssel, melyek lehetővé teszik az antigén testkomponensben jelen lévő antitestekhez történő kötődését. Az ilyen feltételek, jellemzően, a fiziológiai hőmérséklet, pH és ionerősség, illetve az antigén feleslegben történő alkalmazása. Az antigén mintával történő inkubálását az antigént tartalmazó immunkomplexek detektálása követi.

Az immunesztetek típusai nagy változékonyságot mutatnak, és az idevonatkozó szakirodalomból számos tesztelőrendszer ismeretes. Például, alkalmazhatók szilárd hordozók vagy immunprecipitáció. A legtöbb tesztben jelölt antitestet vagy polipeptidet alkalmazunk; a jelölők, például, enzimatis, fluoreszcens, kemilumineszcens, radioaktív jelölők vagy színezékek lehetnek. Ismeretesek olyan tesztek, amelyek az immunkomplexből származó jeleket felerősítik; ilyenek, például, a biotint és avidint vagy sztreptavidint alkalmazó tesztek, és az enzimmel jelölt és enzimközvetítette immunesztetek (mint pl. az ELISA- és RIA-teszt).

Az immunesztetek, többek között, heterogén vagy homogén rendszerűek, illetve standard vagy kompetitív típusúak lehetnek. Heterogén rendszerben a polipeptidet jellemzően egy szilárd mátrixhoz vagy hordozóhoz kapcsoljuk, amely az inkubálás után elősegíti a minta polipeptidtől történő elválasztását. Az ilyen célra alkalmas szilárd hordozók példái közé tartozik a nitrocellulóz (például, membrán vagy mikrotiter üregek alakjában); polivinil-klorid (pl. lapok vagy mikrotiter üregek alakjában); polisztirol latex (pl. gyöngyök vagy mikrotiter-tálcák); polivinilidín-fluorid (Immunolon™); diazotált papír, nylon-membránok, aktivált gyöngyök és protein-A gyöngyök. Például, heterogén rendszerben Dynatech Immunolon™ 1 vagy Immunolon™ 2 mikrotiter-tálcák alkalmazhatók. Az antigénhatású polipeptideket tartalmazó szilárd hordozót - a tesztelt mintától történő elkülönítés után és a megkötött antitestek kimutatása előtt – általában leöblítjük. A standard és kompetitív tesztelési típusok szakember számára egyaránt jól ismertek.

Homogén tesztelési rendszerben a tesztelni kívánt mintát antigének kombinációjának oldatával inkubáljuk, például, olyan feltételek mellett, amelyek a létrejövő antigén-antitest komplexek precipitációját eredményezik. Az ilyen tesztek standard és kompetitív típusai egyaránt jól ismertek.

- 5 Standard tesztelési rendszerben az antitestek (pl. anti-HCV antitestek) mennyiségét az antitest-antigén komplexekben közvetlenül határozzuk meg. Ennek során megállapíthatjuk, hogy az említett antitesteken (pl. az anti-HCV antitesteken) lévő epitópot felismerő, jelölt anti-xenogén (pl. anti-humán) antitestek komplexálódás révén kötődnek-e. Kompetitív rendszerben a mintában lévő antitestek (pl. anti-HCV antitestek) mennyiségére egy (jelölt) antitest (vagy  
10 más kompetíciós ligandum) ismert mennyiségének kötődésre gyakorolt kompetíciós hatásának kimutatásával következtethetünk.

- Az antigén-antitest komplexek – az alkalmazott tesztelési rendszertől függően - különféle ismert technikák alkalmazásával detektálhatók. Például, a komplexben lévő jelöletlen antitestek (mint például, anti-HCV antitestek) jelölővel (pl. enzimatiszus jelölővel) komplexált  
15 anti-xenogén immunglobulin konjugátumának alkalmazásával detektálhatók.

Immunprecipitációs vagy agglutinációs tesztekben az antigén és antitest közötti reakció az oldatból vagy szuszpenzióból kicsapódó protein-klasztert hoz létre, amely látható réteget vagy filmet képez. Ha a tesztmintában nincs jelen antitest, ilyen precipitátum nem képződik.

- 20 A találmány szerinti HCV-burokproteineket vagy konformációs epitópokat tartalmazó, specifikus részleteiket a fenti immuntesztek végrehajtására alkalmas készletekbe foglalhatjuk. Az ilyen készletek rendszerint, külön tartályokban, a natív HCV-antigént, (negatív és/vagy pozitív) kontroll antitest-készítményeket, jelölt antitestet (ha az adott tesztípus igényli), illetve jelgeneráló reagenseket (pl. enzim szubsztrátot) tartalmazznak (ha a jelölő közvetlenül nem ad  
25 jelet). A készlet a natív HCV-antigént eleve szilárd mátrixhoz kapcsolva vagy attól elkülönítve, de a hordozóhoz történő kapcsoláshoz szükséges reagensekkel együtt tartalmazhatja. A készlethez rendszerint a teszt végrehajtását elősegítő útmutatást (írott alakban, mágnesszalagon, CD-ROM formájában, stb.) mellékelünk.

- 30 Szilárd fázisként polimerből vagy üvegből készült gyöngyök, nitrocellulóz, mikroszemcsék, reakciótálca üregei, kémcsövek és mágneses gyöngyök alkalmazhatók. A jelgeneráló vegyület enzim, lumineszcens vegyület, kromogén, radioaktív elem vagy kemilumineszcens vegyület lehet. Az alkalmazható enzimek példái közé tartozik az alkalikus foszfatáz, a tormaperoxidáz és a  $\beta$ -galaktozidáz. A jelerősítő vegyületek példáulként említhető a biotin, anti-

biotin és avidin. A jelerősítő vegyületek kötőtagjainak példái közé tartozik a biotin, anti-biotin és avidin. A reumatoid faktor-szerű anyagok hatásainak blokkolása céljából a tesztmintát a reumatoid faktor-szerű anyagok hatásainak blokkolásához megfelelő feltételeknek vetjük alá; közelebbről, a tesztmintát adott mennyiségű anti-humán IgG-vel érintkeztetjük, és a kapott  
5 elegyet annyi ideig és olyan feltételek mellett inkubáljuk, hogy olyan reakcióelegy terméket kapjunk, amely lényegében mentes a reumatoid faktor-szerű anyagoktól.

Közelebbről, a találmány egyik szempontjának megfelelően találmány szerinti HCV-burokprotein vagy részlete diagnosztikai készlet előállítására történő alkalmazását tárjuk fel.

Mivel a találmány szerinti „core”-glikozilált HCV-burokproteinek rendkívül immuno-  
10 gén sajátosságúak, és humorális és celluláris immunreakciót egyaránt képesek serkenteni, szintén a találmány tárgyát képezi egy reagenskészlet HCV-vel összefüggő T-sejt-reakció detektálására, amely oligomer részecskét vagy találmány szerinti tisztított, egyedülálló HCV-burokproteint tartalmaz. A HCV T-sejtes reakció, például, a Leroux-Roels és mtsai. által leírt módon mérhető (ld. a WO 95/12677 számú nemzetközi közzétételi iratot).

A találmány egy további szempontjának megfelelően eljárást tárunk fel HCV-specifiku  
15 kus immunreakció indukálására emlősbén, melynek során az emlősnek találmány szerinti HCV-burokprotein vagy részlete hatásos mennyiségét (adott esetben, gyógyászati szempontból elfogadható adjuvánssal együtt) adagoljuk. A szóban forgó - találmány szerinti HCV-burokprotein vagy részlete hatásos mennyiségének adagolását magában foglaló – eljárás emlősökben HCV-  
20 specifikus antitestek termelődésének indukálására, illetve specifikus T-sejt-funkció indukálására is alkalmazható. Ezen eljárásokban a HCV-burokprotein vagy részlete adagolását megelőzési célból (profilaktikus adagolás), illetve terápiás célból (terápiás adagolás) végezzük.

A találmány egy következő szempontjának megfelelően eljárást tárunk fel emlős im  
munizálására, melynek során az emlősnek találmány szerinti HCV-burokprotein vagy részlete  
25 hatásos mennyiségét – adott esetben gyógyászati szempontból elfogadható adjuvánssal együtt – adagoljuk.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás HCV-vel fertőzött emlős kezelésére, melynek során az emlősnek találmány szerinti HCV-burokprotein vagy részlete hatásos mennyiségét – adott esetben gyógyászati szempontból elfogadható adjuvánssal együtt – ada  
30 goljuk.

A találmány fentebb leírt szempontjai, illetve azok specifikus megvalósítási módjai általánosan szintén alkalmazhatók azon jelentőséggel bíró izolált proteinekre, amelyek eukarióta

sejtekben lejátszódó expresszió termékei, és amelyekre a két különböző HCV-burokproteinre fentebb leírt glikozilációs tulajdonságok jellemzőek.

Közelebbről, szintén a találmány tárgyát képezi az olyan jelentőséggel bíró izolált protein vagy – legalább egy N-glikozilációs helyet tartalmazó - fragmense, amely protein vagy  
 5 proteinfragmens eukarióta sejtben lejátszódó expresszió terméke, és N-glikozilációs helyeinek átlagosan legfeljebb 50 %-a, 51 %-a, 52 %-a, 53 %-a, 54 %-a, 55 %-a, 56 %-a, 57 %-a, 58 %-a, 59 %-a, 60 %-a, 61 %-a, 62 %-a, 63 %-a, 64 %-a, 65 %-a, 66 %-a, 67 %-a, 68 %-a, 69 %-a, 70 %-a, 71 %-a, 72 %-a, 73 %-a, 74 %-a, 75 %-a, 76 %-a, 77 %-a, 78 %-a, 79 %-a vagy 80 %-a „core”-glikozilált. Közelebbről, a szóban forgó protein vagy fragmens N-glikozilációs  
 10 helyeinek több, mint 60 %-a, 61 %-a, 62 %-a, 63 %-a, 64 %-a, 65 %-a, 66 %-a, 67 %-a, 68 %-a, 69 %-a, 70 %-a, 71 %-a, 72 %-a, 73 %-a, 74 %-a, 75 %-a, 76 %-a, 77 %-a, 78 %-a, 79 %-a, 80 %-a, 81 %-a, 82 %-a, 83 %-a, 84 %-a, 85 %-a, 86 %-a, 87 %-a, 88 %-a, 89 %-a, 90 %-a, 91 %-a, 92 %-a, 93 %-a, 94 %-a vagy 95 %-a Man(8-10)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal van glikozilálva. A fenti N-glikozilációs sajátság további részletezéseként, a  
 15 Man(7)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal glikozilált helyek számának a Man(8)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal glikozilált helyek számához viszonyított aránya legfeljebb 0,15; 0,2; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,44; 0,45 vagy 0,50. Ezen túlmenően, az oligomannózzok kevesebb, mint 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % vagy 5 % terminális  $\alpha$ 1,3-mannózt tartalmaznak.

20 A találmány egy további alternatív szempontjának megfelelően, olyan jelentőséggel bíró izolált proteint vagy – legalább egy N-glikozilációs helyet tartalmazó - fragmensét tárjuk fel, amely eukarióta sejtben lejátszódó expresszió terméke, és N-glikozilációs helyeit oligomannózzok foglalják el, ahol is a Man(7)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal glikozilált helyek számának a Man(8)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal glikozilált helyek számához viszonyított aránya legfeljebb 0,15; 0,2; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,44; 0,45 vagy 0,50. A fenti N-glikozilációs sajátság további részletezéseként, az oligomannózzok kevesebb, mint 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % vagy 5 % terminális  $\alpha$ 1,3-mannózt tartalmaznak.  
 25

Közelebbről, az említett jelentőséggel bíró protein vagy fragmense élesztősejtben, például, *Hansenula* sejtben lejátszódó expresszió terméke. Az említett jelentőséggel bíró protein vagy fragmense, például, virális burokprotein vagy fragmense, mint pl. HCV-burokprotein vagy HBV (hepatitis B) burokprotein vagy ezek fragmense. A virális burokproteinek további jellemző példái közé tartozik a humán immundeficiencia vírus (HIV) gp120-burokproteinje, il-

letve a Flaviviridae rendbe tartozó vírusok vírusburok-proteinjei. Általánosan, az említett jelentőséggel bíró protein vagy fragmense tetszőleges protein lehet, amelynek szüksége a találmány szerinti N-glikozilációs sajátságokra.

A „HCV-rekombináns vaccinia vírus” kifejezésen olyan vaccinia vírust értünk, amely HCV-proteint vagy részletét kódoló nukleinsav-szekvenciát tartalmaz.

Ahogy a leírásban használjuk, a „HCV-burokproteinből álló HCV-vírus-szerű részecske” és „HCV-burokproteinből álló oligomer részecskék” kifejezéseken specifikus természetű és alakú struktúrákat értünk, amelyek a HCV-E1- és/vagy HCV-E2-burokproteinek (melyek önmaguk egy vagy két E1- és/vagy E2-monomerből állnak) több alapvető egységét tartalmazzák. Tudni kell, hogy a találmány szerinti részecskék, definíció szerint, mentesek a fertőzőképes HCV-RNS-genomtól. A találmány szerinti részecskék magasabb rendű, gömb természetű részecskék lehetnek, amelyek burokproteinek alkotta héjből állnak, amely üres is lehet, és amelybe lipidek, detergenssek, HCV-„core”-protein, illetve adjuvánsmolekulák foglalhatók. Az utóbbi részecskék liposzómákba vagy apolipoproteinekbe (pl. apolipoprotein-B-be vagy kis sűrűségű lipoproteinekbe) vagy egyéb - a részecskék specifikus szervbe vagy szövetbe történő célbajuttatására alkalmas anyagokba - is foglalhatók. Az ilyen üres, gömb alakú részecskéket gyakran „vírusszerű részecskéknek” vagy „VLP”-nek nevezzük. Más módon, a magasabb rendű részecskék kemény, gömb alakú struktúrák lehetnek, amelyek esetében az egész gömb HCV-E1 vagy HCV-E2 burokprotein-oligomerekből áll, amelybe lipidek, detergenssek, HCV-„core”-protein vagy adjuvánsmolekulák is foglalhatók, vagy amely liposzómákba vagy apolipoproteinekbe (pl. apolipoprotein-B-be vagy kis sűrűségű lipoproteinekbe) vagy egyéb - a részecskék specifikus szervbe vagy szövetbe történő célbajuttatására alkalmas - anyagokba (pl. aszialo-glikoproteinekbe) - is foglalhatók. A részecskék - az üres vagy kemény gömbökhöz viszonyítva - kisebb struktúrákból is állhatnak, amelyek rendszerint kör alakúak (ld. később), és általában csupán egyetlen HCV-burokprotein réteget tartalmaznak. Az ilyen kisebb méretű részecskék jellemző példái a rozetta-szerű struktúrák, amelyek kevesebb (rendszerint 4-16) HCV-burokproteinből állnak. Ez utóbbiak egy speciális példája az E1s-sel 0,2 %-os CHAPS-oldatban létrehozható kisebb részecskékből áll (ld. a példákban), amelyek látszólag 8-10 E1s-monomert tartalmaznak. Az ilyen rozetta-szerű struktúrák rendszerint síkban szerveződnek és kör alakúak (pl. kerék alak). Az ilyen részecskékbe is foglalhatók lipidek, detergenssek, HCV-„core”-protein vagy adjuvánsmolekulák, illetve maguk a részecskék liposzómákba vagy apolipoproteinekbe (pl. apolipoprotein-B-be vagy kis sűrűségű lipoproteinekbe) vagy egyéb - a részecskék specifikus szervbe vagy szövetbe történő célbajuttatására alkalmas -

anyagokba foglalhatók. Ezek a kisebb részecskék kisméretű gömböt vagy globuláris struktúrákat is alkothatnak, amelyek ugyancsak kevés HCV-E1- vagy HCV-E2-burokproteint tartalmaznak, amelyekbe lipidek, detergenssek, HCV-„core”-protein vagy adjuvánsmolekulák is foglalhatók, vagy amely liposzómákba vagy apolipoproteinekbe (pl. apolipoprotein-B-be vagy kis sűrűségű lipoproteinekbe) vagy amelyek önmaguk egyéb - a részecskék specifikus szervbe vagy szövetbe történő célbajuttatására alkalmas - anyagokba foglalhatók. A felsorolt részecskék - szakember számára jól ismert dinamikus fényszóródási technikák alkalmazásával meghatározott - mérete (átmérője) rendszerint 1-100 nm, előnyösebben 2-70 nm, még előnyösebben 2-40 nm, 3-20 nm, 5-16 nm, 7-14 nm vagy 8-12 nm.

Szintén a találmány tárgyát képezi egy eljárás immunesztben vagy vakcinában alkalmazható „core”-glikozilált hepatitis-C vírus (HCV) -burokpoteinek vagy tetszőleges részleteik tisztítására, mely eljárás a következő lépésekből áll:

(i) HCV-E1- és/vagy HCV-E2-proteint vagy tetszőleges részletüket kódoló „envelope”-génnel transzformált glikoziláció-deficiens *Hansenula* vagy *Saccharomyces* törzseket megfelelő tenyésztő tápközegben tenyésztünk;

(ii) előidézzük a HCV-E1- és/vagy HCV-E2-gén (vagy tetszőleges részletük) expresszióját; és

(iii) a tenyésztő tápközegből tisztítjuk a „core”-glikozilált HCV-E1- és/vagy HCV-E2-proteint (vagy tetszőleges részletét).

Feltárunk továbbá egy eljárást immunesztben vagy vakcinában alkalmazható „core”-glikozilált hepatitis-C vírus (HCV) -burokpoteinek vagy tetszőleges részleteik tisztítására, mely eljárás a következő lépésekből áll:

(i) HCV-E1- és/vagy HCV-E2-proteint vagy tetszőleges részletüket kódoló „envelope”-génnel transzformált glikoziláció-deficiens *Hansenula* vagy *Saccharomyces* törzseket megfelelő tenyésztő tápközegben tenyésztünk;

(ii) előidézzük a HCV-E1- és/vagy HCV-E2-gén (vagy tetszőleges részletük) expresszióját; és

(iii) a transzformált gazdasejt feltárását követően tisztítjuk az intracellulárisan expresszált „core”-glikozilált HCV-E1- és/vagy HCV-E2-proteint (vagy tetszőleges részletét).

Feltárunk továbbá egy eljárást immunesztben vagy vakcinában alkalmazható „core”-glikozilált hepatitis-C vírus (HCV) -burokpoteinek vagy tetszőleges részleteik tisztítására, mely eljárás a következő lépésekből áll:

(i) HCV-E1- és/vagy HCV-E2-proteint vagy tetszőleges részletüket (mely protein vagy proteinrészlet legalább két ciszteint tartalmaz) kódoló „envelope”-génnel transzformált glikoziláció-deficiens *Hansenula* vagy *Saccharomyces* törzseket megfelelő tenyésztő tápközegekben tenyésztünk;

5 (ii) előidézzük a HCV-E1- és/vagy HCV-E2-gén (vagy tetszőleges részletük) expresszióját; és

(iii) a tenyészetből tisztítjuk a „core”-glikozilált HCV-E1- és/vagy HCV-E2-proteint (vagy tetszőleges részletét), amelyben a ciszteinek kémiai és/vagy enzimatisz módszerrel reverzibilisen védve vannak.

10 Feltárunk továbbá egy eljárást immuntesztben vagy vakcinában alkalmazható „core”-glikozilált hepatitis-C vírus (HCV) -burokpoteinek vagy tetszőleges részleteik tisztítására, mely eljárás a következő lépésekből áll:

(i) HCV-E1- és/vagy HCV-E2-proteint vagy tetszőleges részletüket (mely protein vagy proteinrészlet legalább két ciszteint tartalmaz) kódoló „envelope”-génnel transzformált glikoziláció-deficiens *Hansenula* vagy *Saccharomyces* törzseket megfelelő tenyésztő tápközegekben tenyésztünk;

(ii) előidézzük a HCV-E1- és/vagy HCV-E2-gén (vagy tetszőleges részletük) expresszióját; és

20 (iii) a transzformált gazdasejt feltárása után tisztítjuk az intracellulárisan expresszált „core”-glikozilált HCV-E1- és/vagy HCV-E2-proteint (vagy tetszőleges részletét), amelyben a ciszteinek kémiai és/vagy enzimatisz módszerrel reverzibilisen védve vannak.

A találmány egy speciális megvalósítási módja értelmében feltárunk egy eljárást rekombináns „core”-glikozilált HCV élesztőproteinek vagy tetszőleges részleteik tisztítására, melynek során heparin-affinitási kromatográfiát alkalmazunk.

25 Ilyenformán, szintén a találmány tárgyát képezi egy eljárás rekombináns „core”-glikozilált HCV élesztőproteinek vagy tetszőleges részletük tisztítására, amelyek ciszteinjei szulfonálással vannak védve.

Egy következő megvalósítási mód értelmében a „core”-glikozilált HCV élesztőproteinek vagy tetszőleges részletük tisztítása eljárásában a ciszteinek reverzibilis védés helyett kémiai és/vagy enzimatisz módszerrel, irreverzibilisen vannak védve.

30 Egy következő megvalósítási mód értelmében a „core”-glikozilált HCV élesztőproteinek vagy tetszőleges részletük tisztítási eljárásában a ciszteinek irreverzibilis védeke kémiai módszerrel, jó-d-acetamid alkalmazásával van végrehajtva.

Egy következő megvalósítási mód értelmében a „core”-glikozilált HCV élesztőproteinek vagy tetszőleges részletük tisztítási eljárásában a ciszteinek irreverzibilis védeke kémiai módszerrel, NEM vagy Biotin-NEM (vagy ezek elegye) alkalmazásával van végrehajtva.

Szintén a találmány tárgyát képezi egy fentebb meghatározott készítmény, amely további komponens(ek)ként HCV-„core”-proteint, E1-, E2-, P7-, NS2-, NS3-, NS4A-, NS4B-, NS5A- és/vagy NS5B-proteint (vagy ezek részletét) is tartalmaz. A találmány szerinti „core”-glikozilált E1-, E2- és/vagy E1/E2-proteinek, például, egyéb HCV-antigénekkal (így például, „core”-, P7-, NS3-, NS4A-, NS4B-, NS5A- és/vagy NS5B-proteinnel) kombinálhatók. Az NS3-proteinek tisztítása során a ciszteineket előnyösen reverzibilisen módosítjuk, még előnyösebben, szulfonáljuk. Az NS3-proteinek vonatkozásában a reverzibilis módosítási eljárásokat (köztük a szulfonálás) Maertens és mtsai. tárták fel (PCT/EP99/02547, melyet teljes terjedelmében, valamennyi definícióval együtt, a kitanítás részének kell tekinteni).

Szintén a találmány tárgyát képezi egy találmány szerinti „core”-glikozilált burokprotein alkalmazása HCV elleni immunitás indukálására, melynek során a „core”-glikozilált burokproteint vegyületek megfelelő időközök beiktatásával végzett adagolás-sorozatának részeként alkalmazzuk. Ahogy itt használjuk, a „vegyületek megfelelő időközök beiktatásával végzett adagolássorozata” kifejezésen immunreakció kiváltására alkalmazott vegyületek páciensnek történő, megfelelő időközökkel végzett adagolását értjük. Az utóbbi vegyületek a következő komponensek bármelyikét tartalmazhatják: „core”-glikozilált burokprotein, HCV-DNS vakcinakészítmény, HCV-polipeptidek.

Az adagolássorozat a következők adagolását jelentheti:

- (i) HCV-antigén, például, „core”-glikozilált burokprotein megfelelő időközönként történő adagolása;
- (ii) HCV-antigén, például, „core”-glikozilált burokprotein és HCV-DNS vakcinakészítmény kombinációja, ahol is a „core”-glikozilált burokprotein oligomer részecskéi és a HCV-DNS vakcinakészítmény egyidejűleg vagy különböző időpontokban adagolható (ideértve a felváltott adagolást); vagy
- (iii) az (i) vagy (ii) pont szerinti adagolás, esetleg egyéb HCV-peptidekkel kombinálva (megfelelő időközönként).

Tudni kell, hogy egy HCV-DNS vakcinakészítmény HCV-burokpeptidet (E1-, E2-, E1/E2-peptidet, NS3-peptidet, egyéb HCV-peptidet vagy e peptidek részleteit) kódoló nukleinsavat tartalmaz. Tudni kell továbbá, hogy az említett HCV-peptidek HCV-burokpeptidek (köztük az E1-, E2- és E1/E2-peptidek), illetve egyéb HCV-peptidek vagy részleteik lehetnek.

Az „egyéb HCV-peptidek” kifejezésen tetszőleges HCV-peptidet vagy fragmensét értjük. A fenti (ii) pontban említett HCV-DNS vakcinakészítmény, előnyösen, HCV-burokpeptideket kódoló nukleinsavakat, még előnyösebben, HCV-burokpeptideket kódoló nukleinsavakat - lehetőleg HCV-NS3-DNS vakcinakészítménnyel kombinálva - tartalmaz. E tekintetben tudni kell, hogy egy HCV-DNS vakcinakészítmény plazmidvektort tartalmaz, amely – adott esetben, transzkripció szabályozóelemekhez működőképesen kapcsolva - fentebb leírt HCV-peptidet kódoló polinukleotid-szekvenciát hordoz. Ahogy itt használjuk, a „plazmidvektor” kifejezésen olyan nukleinsav-molekulát értünk, amely képes egy hozzá kapcsolt másik nukleinsav szállítására. A találmány szerinti megoldás szempontjából azok az előnyös vektorok, amelyek autonóm replikációra és/vagy a hozzájuk kapcsolt nukleinsavak expresszáltatására képesek. A plazmidvektorok általában – de nem minden esetben – cirkuláris kettős szálú DNS-molekulák, amelyek, vektor alakban, nem kapcsolódnak a kromoszómához. Ahogy itt használjuk, a „polinukleotid-szekvencia” kifejezésen polinukleotidokat értünk, így például dezoxiribonukleinsavat (DNS), és, alkalmas módon, ribonukleinsavat (RNS). A polinukleotid-szekvencia kifejezés jelentése kiterjed az RNS-ek vagy DNS-ek nukleotid-analógokból álló analógjaira, továbbá az egyszeres szálú (szensz vagy antiszensz) és kettős szálú polinukleotidokra. Ahogy itt használjuk, „transzkripció szabályozóelem”-en kulcsfontosságú elemeket tartalmazó nukleotidszekvenciát értünk, amely gerincesek törzsébe tartozó egyed élő sejtjébe bejuttatva képes a sejt celluláris gépezetét úgy szabályozni, hogy a sejt a polinukleotid által kódolt transzlációs termékeket termelje. A „működőképesen kapcsolt” kifejezésen olyan egymáshoz rendeltetést értünk, amelynek eredményeként a komponensek képesek szokásos funkciójuk kifejtésére. Ennek megfelelően, egy nukleotidszekvenciához működőképesen kapcsolt transzkripció szabályozóelemek képesek az említett nukleotidszekvencia expresszáltatására.

Szakember számára kézenfekvő, hogy különböző transzkripció promóterek, terminációs szekvenciák, hordozóvektorok vagy specifikus génszekvenciák egyaránt sikeresen alkalmazhatók.

Más módon, a DNS-vakcina élő vektor (például, adenovírus, kanárihimlő vírus, MVA és hasonló) alkalmazásával is bejuttatható a páciensekbe.

A találmányt a továbbiakban kísérleti példák bemutatásán keresztül ismertetjük, melyek csupán a találmány előnyös megvalósítási módjait szemléltetik, anélkül, hogy a találmány igényelt oltalmi körét bármilyen módon korlátoznák.

# 1. példa

## pFPMT-MF $\alpha$ -E1-H6 ingázóvektor előállítás

*Hansenula polymorpha* transzformálására alkalmas plazmidokat a következők szerint állítottunk elő. A pFPMT-MF $\alpha$ -E1-E6 ingázóvektort többlépéses eljárással hoztuk létre. Először a HCV-E1s-proteint (2. azonosítószámú szekvencia) kódoló nukleinsavat a CHH-vezetőszekvencia (CHH = *Carcinus meanas* hiperglikémia hormon) után klónoztuk, melyet később MF $\alpha$  (*Saccharomyces cerevisiae* „ $\alpha$ -mating” faktor) vezetőszekvenciával helyettesítettünk.

Először, az ún. „seamless” klónozási eljárás [ld. Padgett és Sorge (1996)] alkalmazásával, egy pUC18-származékot hoztunk létre, amely a CHH-E1H6-egységet EcoRI/BamHI-fragmentsként tartalmazza. Ehhez az E1s-H6-ot kódoló DNS-fragmenst és a pCHH-Hir-eredetű akceptorplazmidot polimeráz láncreakcióval, az alábbiak szerint állítottuk elő.

### Az E1s-H6-szekvenciát kódoló DNS-fragmens létrehozása

Az E1-H6-DNS-szekvenciát [amely az E1s-protein 192-326. aminosavaiból + hat hisztidinből álló HCV-1b-típusú E1s-proteint (5. azonosítószámú szekvencia) kódolja] polimeráz láncreakció alkalmazásával, a pGEMTE1sH6-plazmidból (6. azonosítószámú szekvencia; 1. ábra) izoláltuk. A polimeráz láncreakció során a következő láncindító-oligonukleotidokat alkalmaztuk:

CHHE1-F: 5'-AGTTACTCTTCA.AGGTATGAGGTGCGCAACGTGTCCG-3' (7. azonosítószámú szekvencia) – az Eam1104I-felismerési helyet aláhúzással jelöltük, míg a pont a hasítási helyet jelöli. A félkövér betűtípussal szedett bázisok komplementerek a „CHH-links”-láncindító megfelelő bázisaival. A többi bázis az E1 kezdőrégióján (192-326.) belül, „szensz” irányban hibridizálódik;

CHHE1-R:

5'-AGTTACTCTTCA.CAGGGATCCTCCTTAATGGTGATGGTGGTGCC-3' (8. azonosítószámú szekvencia) – az Eam1104I-felismerési helyet aláhúzással jelöltük, míg a pont a hasítási helyet jelöli. A félkövér betűtípussal szedett bázisok komplementerek az „MF30-rechts”-láncindító megfelelő bázisaival. A későbbi klónozási műveletekhez hasznos BamHI-helyet alkotó bázisokat dőlt betűkkel szedtük. A többi bázis az E1-H6-egység végén (ideértve a stop-kodont és a stop-kodon és a BamHI-hely között további három bázist), „antiszensz” irányban hibridizálódik.

A reakcióelegy összetétele a következő volt: 50 µL össztérfogatban 20 ng, Eco311-gyel linearizált pGEMTE1sH6-plazmid; 0,2 µM CHHE1-F-láncindító és 0,2 µM CHHE1-R-láncindító; dNTP-k (mindegyik 0,2 µM koncentrációban); 1 x puffer-2 (Expand Long Template PCR System; Boehringer; katalógusszám: 1681 834); 2,5 egység polimeráz-mix (Expand Long Template PCR System; Boehringer; katalógusszám: 1681 834).

A PCR-t az 1. program szerint hajtottuk végre, amely a következő lépésekből áll:

1. denaturálás 95 °C-on, öt percig;
2. inkubálás 10 ciklusban, ciklusonként 95 °C-on 30 másodperces denaturálás; 65 °C-on 30 másodperces hibridizáltatás; és 68 °C-on 130 másodperces láncosszabbítás;
- 10 3. termináció 4 °C-on.

Ezt követően az 1. programmal kapott mintához 5 µL 10x puffer-2-t (Expand Long Template PCR System; Boehringer; katalógusszám: 1681 834), 40 µL vizet és 5 µL – 2 mM dATP, 2 mM dGTP és 2 mM dTTP, illetve 10 mM 5-metil-dCTP összetételű - elegyet adtunk, majd további amplifikációt végeztünk, melyet a 2. program szerint hajtottunk végre:

- 15 1. denaturálás 95 °C-on, öt percig;
2. inkubálás 5 ciklusban, ciklusonként 95 °C-on 45 másodperces denaturálás; 65 °C-on 30 másodperces hibridizáltatás; és 68 °C-on 130 másodperces láncosszabbítás;
3. termináció 4 °C-on.

#### pCHH-Hir-eredetű akceptorplazmid előállítása

- 20 Az akceptorfragmenst a pCHH-Hir-plazmidből (9. azonosítószámú szekvencia; 2. ábra), polimeráz láncreakcióval állítottuk elő. Ez a fragmens a pCHH-Hir-plazmid csaknem teljes egészét magában foglalja (azzal a különbséggel, hogy a Hir-t kódoló szekvencia a PCR-termékben nincs jelen). A polimeráz láncreakciót a következő láncindító-oligonukleotidok alkalmazásával hajtottuk végre:

- 25 1. CHH-links: 5'-agttactcttca.cctctttccaacgggtgtgtag-3'  
(10. azonosítószámú szekvencia) - az Eam1104I-felismerési helyet aláhúzással jelöltük, míg a pont a hasítási helyet jelöli. A félkövér betűtípussal szedett bázisok komplementerek a CHHE1-F-láncindító megfelelő bázisaival. A többi bázis a CHH-szekvencia végéhez, „antiszensz” irányban hibridizálódik.
- 30 2. MF30-rechts: 5'-agtcactcttca.ctgcaggcatgcaagcttggcg-3'  
(11. azonosítószámú szekvencia) - az Eam1104I-felismerési helyet aláhúzással jelöltük, míg a pont a hasítási helyet jelöli. A félkövér betűtípussal szedett bázisok komplementerek a

CHHE1-R-láncindító megfelelő bázisaival. A meg nem jelölt bázisok a pUC18-plazmid szekvenciájában, a pCHH-Hir klónozott CHH-Hirudin HL20 szekvenciája mögé hibridizálódnak.

A reakcióelegy összetétele a következő volt: 50 µL össztérfogatban 20 ng, Eco311-gyel linearizált pGEMTE1sH6-plazmid; 0,2 µM CHH-links-láncindító és 0,2 µM MF30-rechts-láncindító; dNTP-k (mindegyik 0,2 µM koncentrációban); 1x puffer-2 (Expand Long Template PCR System; Boehringer; katalógusszám: 1681 834); 2,5 egység polimeráz-mix (Expand Long Template PCR System; Boehringer; katalógusszám: 1681 834).

A polimeráz láncreakciót az 1. program alkalmazásával, a fentebb leírtak szerint hajtottuk végre.

Ezt követően az 1. programmal kapott mintához 5 µL 10x puffer-2-t (Expand Long Template PCR System; Boehringer; katalógusszám: 1681 834), 40 µL vizet és 5 µL - 2 mM dATP, 2 mM dGTP és 2 mM dTTP, illetve 10 mM 5-metil-dCTP összetételű - elegyet adtunk, majd – a fentebb leírt 2. program szerint - további amplifikációt végeztünk.

#### A pCHHE1-vektor előállítása

A fentiek szerint polimeráz láncreakcióval előállított, E1s-H6-ot kódoló DNS-fragmentst és pCHH-Hir-eredetű akceptorplazmidot PCR-termék-tisztító reagenskészlet (Qiagen) alkalmazásával, a szállító útmutatásai szerint tisztítottuk. Ezt követően a tisztított fragmentseket külön-külön Eam1104I-vel emésztettük, majd az E1s-H6-DNS-fragmentst – T4-ligáz (Boehringer) alkalmazásával, a szállító útmutatásait követve – a pCHH-Hir-eredetű akceptorplazmidba ligáltuk.

A ligálási eleggyel *E. coli* XL-Gold sejteket transzformáltunk, és több ampicillin-rezisztens telepől izolált plazmid-DNS-t EcoRI-gyel és BamHI-gyel végzett emésztéssel analizáltunk, és kiválasztottunk egy pozitív klónt, melyet pCHHE1-nek neveztünk el.

#### A pFPMT-CHH-E1H6-vektor előállítása

A pCHHE1-klón EcoRI/BamHI-fragmentst – T4-ligáz (Boehringer) alkalmazásával, a szállító útmutatásait követve – EcoRI-gyel és BamHI-gyel emésztett pFPMT121-vektorba (12. azonosítószámú szekvencia; 3. ábra) ligáltuk. A ligálási eleggyel *E. coli* DH5αF'-sejteket transzformáltunk. A plazmid-DNS restriktációs mintázata alapján több transzformánst is vizsgáltunk, és egy pozitív klónt megtartottunk, melyet pFPMT-CHH-E1H6-nak (13. azonosítószámú szekvencia; 4. ábra) neveztünk el.

### A pFPMT-MF $\alpha$ -E1-H6 ingázóvektor előállítás

A pFPMT-MF $\alpha$ -E1-H6 ingázóvektort az alábbi három fragmens ligálásával hoztuk létre:

1. EcoRI-gyel és BamHI-gyel emésztett, 6,961 kb-os pFPMT121 (12. azonosítószámú szekvencia; 3. ábra);
2. a pUC18-Mfa 0,245 kb-os EcoRI/HindIII-fragmense (62. azonosítószámú szekvencia; 36. ábra); és
3. a pFPMT-CHH-E1H6-plazmidból származó 0,454 kb-os PCR-termék 0,442 kb-os HindIII/BamHI-fragmense.

A 3. fragmens forrásul szolgáló, 0,454 kb-os PCR-terméket polimeráz láncreakcióval, a következő láncindító-oligonukleotidok alkalmazásával kaptuk:

1. láncindító: Mfa-E1 f-Hi: 5'-aggggtaagcttgataaaaggtatgaggtgcgcaacgtgtccgggatgt-3' (14. azonosítószámú szekvencia);
2. láncindító: E1 back-Bam: 5'-agttacggatccttaatggtgatggtggtggtgccagttcat-3' (15. azonosítószámú szekvencia).

A reakcióelegy összetétele a következő volt: 50  $\mu$ L végtérfogatban 15 ng/ $\mu$ L (EcoRI-gyel linearizált) pFPMT-CHH-E1-H6; Mfa-E1 f-Hi láncindító-oligonukleotid (50  $\mu$ M), 0,25  $\mu$ L; E1 back-Bam láncindító-oligonukleotid (50  $\mu$ M), 0,25  $\mu$ L; dNTP-k (mindegyik 2 mM koncentrációban), 5  $\mu$ L; DMSO, 5  $\mu$ L; víz, 33,5  $\mu$ L; Expand Long Template PCR System (Boehringer Mannheim; katalógusszám: 1681 834); 10-szeres koncentrációjú puffer-2, 5  $\mu$ L; Expand Long Template PCR System polimeráz-elegy (1 egység/ $\mu$ L), 0,5  $\mu$ L.

A PCR-program a következő lépésekből állt:

1. 5 perces denaturálás 95 °C-on;
2. 29 ciklusos inkubálás, ciklusonként 95 °C-on 45 másodperces denaturálás; 55 °C-on 45 másodperces hibridizáltatás; és 68 °C-on 40 másodperces lánchosszabbítás;
3. termináció 4 °C-on.

Az alkalmazott láncindítóknak megfelelően, a polimeráz láncreakcióval kapott 0,454 kb-os termék az E1(192-326) protein kodonjait, valamint hat hisztidint kódoló kodont és egy TAA stop-kodont tartalmazott, melyet 5'-irányban az MF $\alpha$  pre-pro szekvencia 22 3'-végi bázispárja (köztük a klónozáshoz szükséges HindIII-helyet és egy hat bázispáros túlnyúlást), 3'-irányban pedig klónozáshoz szükséges BamHI-hely és egy hat bázisos túlnyúlás szegélyez.

A ligálási reakciót T4-DNS-ligázzal (Boehringer Mannheim), a szállító által javasolt feltételek alkalmazásával hajtottuk végre (mintatérfogat: 20  $\mu$ L).

A ligálási eleggyel *E. coli* HB101-sejteket transzformáltunk, és több transzformánsból izolált plazmidok restrikciós enzimes analízisét követően több pozitív klónt tartottunk vissza.

- 5 Kiválasztottunk egy pozitív plazmidot, melyet pFPMT-MF $\alpha$ -E1-H6-nak neveztünk el (16. azonosítószámú szekvencia; 5. ábra).

## 2. példa

### A pFPMT-CL-E1-H6 ingázóvektor előállítás

- 10 *Hansenula polymorpha* transzformálására alkalmas plazmidokat a következők szerint állítottunk elő. A pFPMT-CL-E1-E6 ingázóvektort többlépéses eljárással, pFPMT-MF $\alpha$ -E1-H6-vektorból (16. azonosítószámú szekvencia; 5. ábra) kiindulva hoztuk létre.

- Első lépésként, a pFPMT-MF $\alpha$ -E1-H6-vektor MF $\alpha$ -E1-H6 leolvasási fázisát pUC18-vektorba szubklónoztuk. Ennek során a pFPMT-MF $\alpha$ -E1-H6-vektor 1,798 kb-os SalI/BamHI-fragmensét (amely FMD-promótert és az MF $\alpha$ -E1-H6 kódolószekvenciáját tartalmazza), T4-  
15 ligáz (Boehringer) alkalmazásával, a forgalmazó útmutatásai szerint, a pUC18-vektor SalI/BamHI-fragmenséhez ligáltuk, miáltal a 6. ábrán bemutatott plazmidot kaptuk (17. azonosítószámú szekvencia), melyet pMa12-1-nek (pUC18-FMD-MF $\alpha$ -E1-H6) neveztünk el. A ligálási eleggyel *E. coli* DH5 $\alpha$ F'-sejteket transzformáltunk. Több ampicillin-rezisztens telepet gyűjtöttünk össze, melyekből plazmid-DNS-t izoláltunk, és azokat restrikciós enzimes emésztéssel analizáltuk. Az MF $\alpha$ -E1-H6-kódolószekvencia bázissorrendjének meghatározása céljából egy pozitív klónt további vizsgálatnak vetettünk alá. A megfelelő klónt - az MF $\alpha$  pre-pro-szekvencia madáreredetű lizozim-preszekvenciával („CL”, amely a madáreredetű lizozim 1-18. aminosavainak felel meg; 1. azonosítószámú szekvencia) történő helyettesítése céljából - PCR-közvetítette mutagenézisben alkalmaztuk. E PCR-közvetítette mutagenézis alapját a teljes  
25 plazmid olyan láncindítók alkalmazásával történő amplifikálása képezi, amelyek 5'-végükön a kívánt módosításokat hordozzák. A későbbi lépések során a lineáris PCR-termék végeit – az önligálást megelőzően – módosítva a kívánt, módosított plazmidhoz jutottunk. A polimeráz láncreakció során a következő láncindító-oligonukleotidokat alkalmaztuk:

1. láncindító: CL-hin: 5'-tgcttcctaccactagcagcactaggattaggtgcgcaacgtgtccggg (18. azonosítószámú szekvencia);  
30 2. láncindító: CL-her-neu: 5'-tagtactagtagtaggcttcgcatgaattcccgatgaaggcagagagcg (19. azonosítószámú szekvencia).

E láncindítók aláhúzással jelölt 5'-régioi a madá eredetű lizozim pre-szekvencia kb. felének kodonjait tartalmazzák. A CL-her-neu-láncindító SpeI restrikciós helyet tartalmaz, melyet dőlt betűkkel jelöltünk. A láncindítók aláhúzás nélküli régiói az E1 192-199. aminosavainak kodonjaival (CL-hin), illetve a „ATG” start-kodonnal, az EcoRI-helyen keresztül az FMD-promóter –19. pozíciójáig (az EcoRI-helytől számítva) hibridizálódnak. A láncindítókat a teljes pMA12-1-plazmid amplifikálására terveztük, ezáltal az MF $\alpha$  pre-pro-szekvenciájának kodonjait a madá eredetű lizozim pre-szekvenciájának kodonjaival helyettesítve.

A polimeráz láncreakcióhoz alkalmazott reakcióelegy összetétele a következő volt: pUC18-FMD-MF $\alpha$ -E1-H6 (pMA-12-1; 1,3 ng/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L; CL-hin-láncindító (100  $\mu$ M), 2  $\mu$ L; CL-her-neu-láncindító (100  $\mu$ M), 2  $\mu$ L; dNTP-k (mindegyik 2,5 mM koncentrációban), 8  $\mu$ L; víz (76  $\mu$ L); Expand Long Template PCR System (Boehringer; katalógusszám: 1681 834) 10-szeres koncentrációjú puffer-2 (10  $\mu$ L); 1 egység/ $\mu$ L polimeráz-elegy (Expand Long Template PCR System; Boehringer), 0,75  $\mu$ L.

A polimeráz láncreakciót a következő lépésekből álló program szerint hajtottuk végre:

1. denaturálás 95 °C-on, 15 percig;
2. inkubálás 35 ciklusban; ciklusonként 95 °C-on 30 másodperces denaturálás, 60 °C-on egy perces hibridizáltatás, és 72 °C-on egy perces lánchosszabbítás;
3. termináció 4 °C-on.

A kapott PCR-termék megfelelő méretét (3,5 kb) agaróz-gélelektroforézissel ellenőriztük, majd a 3'-A túlnyúlásokat T4-polimerázzal eltávolítottuk, miáltal 3'- és 5'-OH csoportokat tartalmazó tompa végeket kaptunk. Ennek során a PCR-terméket T4-polimerázzal (Boehringer, 1 egység/ $\mu$ L) kezeltük: a PCR-reakcióelegy maradék 95  $\mu$ L-éhez 1  $\mu$ L T4-polimeráz-oldatot és 4  $\mu$ L dNTP-elegyet (mindegyik 2,5 mM koncentrációban) adtunk, majd a mintát 37 °C-on 20 percig inkubáltuk. Ezt követően a DNS-t etanollal precipitáltuk és 16  $\mu$ L vízben felvettük.

Ezután a tompa végű PCR-termékhez kinázreakcióval 5'-végi foszfátcsoportokat kapcsoltunk. Ennek során a tompa végű PCR-termék 16  $\mu$ L térfogatú oldatához 1  $\mu$ L T4-polinukleotid-kináz oldatot (Boehringer; 1 egység/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L tízszeres koncentrációjú T4-polinukleotid-kináz reakciópuffert (Boehringer) és 1  $\mu$ L ATP-oldatot (10 mM) adtunk, majd a mintát 37 °C-on 30 percig inkubáltuk. Ezt követően a DNS-t 1 %-os agarózgélre vittük fel, és a gélről a kívánt terméknek megfelelő csíkot gélextrakciós reagenskészlet (Qiagen) alkalmazásával,



MF $\alpha$ -E2-H6-nak (22. azonosítószámú szekvencia, 11. ábra), illetve pMPT-MF $\alpha$ -E2-H6-nak (23. azonosítószámú szekvencia, 12. ábra) neveztük el.

#### 4. példa

##### pFPMT-CL-E2-H6 ingázóvektor előállítása

- 5 A pFPMT-CL-E2-H6 ingázóvektort háromlépéses eljárással állítottuk össze. Létrehoztunk egy köztes konstrukciót, amelyben az E2-kódolószekvenciát a *Schwanniomyces accidentalis*  $\alpha$ -amilázának szignálszekvenciája mögé klónoztuk. Ezt az ún. „seamless” klónozási eljárással hajtottuk végre [ld. Padgett és Sorge (1996)].

##### E2s-H6-proteint kódoló DNS-fragmens előállítása

- 10 Először a pSP72E2H6-plazmidből (24. azonosítószámú szekvencia, 11. ábra), polimeráz láncreakció alkalmazásával az E2-H6-proteint (a HCV-E2 384-673. aminosavai + „VIEGR” kapcsolópeptid + hat hisztidin; 5. azonosítószámú szekvencia) kódoló DNS-szekvenciát amplifikáltuk. A polimeráz láncreakciót a következő láncindítók alkalmazásával hajtottuk végre:

- 15 MF30E2/F: 5'-agtcactcttca.aggcataccgcgtgtcaggagg-3' (26. azonosítószámú szekvencia), amelyben az Eam1104I-felismerési helyet aláhúzással jelöltük, míg a pont az enzim hasítási helyét jelöli. Az *S. occidentalis* szignálszekvencia kodonjait félkövér betűtípussal szedve jelöltük. A meg nem jelölt szekvencia az E2 (a HCV-E2 384-390. aminosavai) kodonjaival hibridizálódik.

- 20 MF30E2/R: 5'-agtcactcttca.caggatccttagtgatggtggtgatg-3' (27. azonosítószámú szekvencia), amelyben az Eam1104I-felismerési helyet aláhúzással jelöltük, míg a pont az enzim hasítási helyét jelöli. A félkövér betűtípussal szedett bázisok komplementerek az „MF30-Rechts” láncindító (ld. később) félkövér betűtípussal szedett bázisaival. A konstrukcióba beépíteni kívánt BamHI-helyet dőlt betűkkel szedve jelöljük. A meg nem jelölt szekvencia az E2(384-673)-VIEGR-H6 (5. azonosítószámú szekvencia) stop-kodonjával és hat láncvégi His-kodonjával aminosavai) kodonjaival hibridizálódik.
- 25

A reakcióelegy összetétele a következő volt: 50  $\mu$ L ösztérfogatban a pSP72E2H6-plazmid 1,33 kb-os EcoRI/BglII-fragmense (20 ng); MF30E2/F- és MF30E2/R-láncindító (0,2-0,2  $\mu$ M), dNTP-k (mindegyik 0,2  $\mu$ M); 1x puffer-2 (Expand Long Template PCR System; Boehringer; katalógusszám: 1681 834); 2,5 egység polimeráz-elegy (Expand Long Template PCR System; Boehringer; katalógusszám: 1681 834).

30

A polimeráz láncreakciót a 3. program szerint hajtottuk végre, amely a következő lépésekből áll:

1. denaturálás 95 °C-on, öt percig;
2. inkubálás 10 ciklusban, ciklusonként 95 °C-on 30 másodperces denaturálás; 65 °C-on 30 másodperces hibridizáltatás; és 68 °C-on egy perces lánchosszabbítás;
3. termináció 4 °C-on.

Ezt követően a 3. programmal kapott mintához 10 µL 10-szeres koncentrációjú puffer-2-t (Expand Long Template PCR System; Boehringer; katalógusszám: 1681 834), 40 µL vizet és 5 µL – 2 mM dATP, 2 mM dGTP és 2 mM dTTP, illetve 10 mM 5-metil-dCTP összetételű - elegyet adtunk, majd további amplifikációt végeztünk, melyet a 4. program szerint hajtottunk végre:

1. denaturálás 95 °C-on, öt percig;
2. inkubálás 5 ciklusban, ciklusonként 95 °C-on 45 másodperces denaturálás; 65 °C-on 30 másodperces hibridizáltatás; és 68 °C-on egy perces lánchosszabbítás;
3. termináció 4 °C-on.

#### pMF30-eredetű akceptorplazmid előállítása

A pMF30-plazmidból (28. azonosítószámú szekvencia, 13. ábra) származó második fragmens, az amlikon, csaknem a teljes pMF30-plazmidot magában foglalja (a *S. occidentalis* érett α-amilázának kodonjai kivételével), a klónozáshoz szükséges módosításokat megfelelő lánccindítók tervezésével építettük be. A következő lánccindító-párt alkalmaztuk:

MF30-Links: 5'-agtcactcttca.cctctgtcaaaaataatcggttgag-3' (29. azonosítószámú szekvencia), amelyben az Eam1104I-felismerési helyet aláhúzással jelöltük, míg a pont az enzim hasítási helyét jelöli. A félkövér betűtípussal szedett „cct” bázisok az MF30E2/F-lánccindító – szintén félkövér betűtípussal jelölt – „agg” bázisokkal (ld. fentebb) komplementerek. A meg nem jelölt és a félkövér betűtípussal jelölt bázisok a pMF30-plazmidban az *S. occidentalis* érett α-amilázát kódoló kodonok 26 terminális bázisaival komplementerek.

MF30-Rechts: 5'-agtcactcttca.ctgcaggcatgcaagcttgcg-3' (11. azonosítószámú szekvencia), amelyben az Eam1104I-felismerési helyet aláhúzással jelöltük, míg a pont az enzim hasítási helyét jelöli. A félkövér betűtípussal szedett „ctg” bázisok komplementerek az MF30E2/R-lánccindító félkövér betűtípussal szedett „cag” bázisaival (ld. fentebb). A meg nem jelölt bázisok a pMF30-plazmidban az *S. occidentalis* α-amiláz stop-kodonjától 3'-irányban lévő pUC18-szekvenciákkal komplementerek.

A reakcióelegy összetétele a következő volt: 50 µL össztérfogatban a BglII-vel linearizált pMF30-plazmid (20 ng); MF30-Links- és MF30-Rechts-láncindító (0,2-0,2 µM), dNTP-k (mindegyik 0,2 µM); 1x puffer-2 (Expand Long Template PCR System; Boehringer; katalógusszám: 1681 834); 2,5 egység polimeráz-elegy (Expand Long Template PCR System; Boehringer; katalógusszám: 1681 834). A polimeráz láncreakciót a fentebb leírt 3. és 4. program szerint hajtottuk végre, azzal a különbséggel, hogy a lánchosszabbítási lépés időtartamát mindkét programban egy percről négy percre növeltük.

#### pAMY-E2-vektor előállítása

Az E2s-H6-ot kódoló DNS-fragmenst és a pMF30-eredetű akceptorplazmidot (melyeket polimeráz láncreakcióval hoztunk létre) 1 %-os agarózgélén gélelektroforézisnek vetettük alá. A PCR-termékeket PCR-termék-tisztító reagenskészlet (Qiagen) alkalmazásával, a forgalmazó útmutatásai szerint tisztítottuk, majd a tisztított fragmenseket, egymástól függetlenül, Eam11004I-endonukleázzal emésztettük. Az E2s-H6-fragmenst T4-ligázzal (Boehringer), a forgalmazó útmutatásai szerint a pMF30-eredetű akceptorplazmidhoz ligáltuk. A ligálási elegyet *E. coli* DH5αF'-sejtek transzformálására alkalmaztuk, majd több klón plazmid-DNS-ét EcoRI/BamHI-emésztéssel analizáltuk. Kiválasztottunk egy pozitív klont, melynek plazmidját pAMY-E2-nek neveztük el, és ezt az alábbiakban leírásra kerülő további módosítások alanyaként használtuk.

#### pUC18-CL-E2-H6-vektor előállítása

A pAMY-E2-plazmidot – az α-amiláz szignálszekvenciája kodonjainak madáreredetű lizozim-pre-szekvencia kodonjaival történő helyettesítése céljából – PCR-közvetítette mutagenézisnek vetettük alá. Ezt „CL”-nek jelöljük, amely a madáreredetű lizozim nyitott leolvasási fázisa első 18 aminosavának felel meg (1. azonosítószámú szekvencia). A mutagenézist a következő láncindító-pár alkalmazásával hajtottuk végre:

CL2-hin: 5'-tgcttcctaccactagcagcactaggacatacccgctgtcaggaggggcag-3';

CL2-her: 5'-tagtactagtattagtaggcttcgcatggaattcactggccgctcgtttacaacgtc-3' (31. azonosítószámú szekvencia).

A láncindítók aláhúzással jelölt 5'-régiói a madáreredetű lizozim-pre-szekvencia kb. felének DNS-szekvenciáját tartalmazzák. A CL2-láncindító SpeI-felismerési helyet (dőlt betűkkel jelölve) és EcoRI-felismerési helyet (dőlt betűkkel, kettős aláhúzással jelölve) tartalmaz. A láncindítók meg nem jelölt régiói az E2 384-392. aminosavait kódoló kodonokkal (CL2-hin), illetve az „atg” start-kodonnal, az EcoRI-helyen keresztül az FMD-promóter -19. pozíci-

ójáig (az EcoRI-helytől számítva) hibridizálódnak. A láncindítókat a teljes pAMY-E2-vektor amplifikálására terveztük, hogy az  $\alpha$ -amiláz szignálszekvenciájának kodonjait a madáreredetű lizozim pre-szekvenciájának kodonjaival helyettesítsük.

A polimeráz láncreakciót a következő lépésekből álló program szerint hajtottuk vég-

5 re:

1. denaturálás 95 °C-on, 15 percig;
2. inkubálás 35 ciklusban; ciklusonként 95 °C-on 30 másodperces denaturálás, 60 °C-on egy perces hibridizáltatás, és 72 °C-on egy perces lánchosszabbítás;
3. termináció 4 °C-on.

10 A polimeráz láncreakcióhoz alkalmazott reakcióelegy összetétele a következő volt: pAMY-E2 (1,2 ng/ $\mu$ L, 1  $\mu$ L); CL2-hin-láncindító (100  $\mu$ M, 2  $\mu$ L); CL2-her-láncindító (100  $\mu$ M, 2  $\mu$ L); dNTP-k (mindegyik 2,5 mM koncentrációban, 8  $\mu$ L); víz (76  $\mu$ L); Expand Long Template PCR System (Boehringer; katalógusszám: 1681 834) 10-szeres koncentrációjú puffer-2 (10  $\mu$ L); Expand Long Template PCR System polimeráz-elegy (1 egység/ $\mu$ L, 0,75  $\mu$ L).

15 A kapott PCR-termék méretét 1 %-os agarózgélén végzett gélelektroforézissel ellenőriztük, majd a PCR-fragmenst - ligálása előtt – a következők szerint módosítottuk. A 3'-A túlnyúlásokat T4-polimerázzal eltávolítottuk, miáltal 3'- és 5'-OH csoportokat tartalmazó tompa végeket kaptunk. A PCR-reakcióelegy maradék 95  $\mu$ L-éhez 1  $\mu$ L T4-polimeráz-oldatot (Boehringer; 1 egység/ $\mu$ L) és dNTP-k (mindegyik 2,5 mM koncentrációban) elegyét (4  $\mu$ L)  
20 adtuk, majd a mintát 37 °C-on 20 percig inkubáltuk. Ezt követően a DNS-t etanollal precipitáltuk és 16  $\mu$ L ioncserélt vízben feloldottuk. Ezután a tompa végű PCR-termékhez kinázreakcióval 5'-végi foszfátcsoportokat kapcsolunk. Ennek során a tompa végű PCR-termék 16  $\mu$ L térfogatú oldatához 1  $\mu$ L T4-polinukleotid-kináz oldatot (Boehringer; 1 egység/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L tízszeres koncentrációjú T4-polinukleotid-kináz reakciópuffert (Boehringer) és  
25 1  $\mu$ L ATP-oldatot (10 mM) adtunk, majd a mintát 37 °C-on 30 percig inkubáltuk.

Ezt követően a DNS-t 1 %-os agarózgélén elválasztottuk, és a gélről a kívánt terméknek megfelelő csíkot gélextrakciós reagenskészlet (Qiagen) alkalmazásával, a forgalmazó útmutatásai szerint izoláltuk. A tisztított termék 50 ng-ját T4-ligáz (Boehringer) alkalmazásával, a forgalmazó útmutatásai szerint, önligálásnak vetettük alá. 16 °C-on végzett 16 órás  
30 inkubálást követően a ligálási elegyben lévő DNS-t etanollal precipitáltuk és 20  $\mu$ L vízben feloldottuk (ligálási minta).

A ligálási minta 10  $\mu$ L-ével *E. coli* DH5 $\alpha$ -F'-sejteket transzformáltunk. Több ampicillin-rezisztens klónt plazmid-DNS-ük restrikciós enzimes emésztésével karakterizáltunk. Az egyik pozitív klónt pUC18-CL-E2-H6-nak neveztük el, és ezt – az alábbiak szerint - további módosításoknak vetettük alá.

#### 5 pFPMT-CL-E1-H6 ingázóvektor előállítása

A pUC18-CL-E2-H6—plazmid 0,966 kb-os - CL-E2(384-673)-VIEGR-H6-szekvenciát hordozó - EcoRI/BamHI-fragmensét EcoRI-gyel és BamHI-gyel emésztett pFPMT121-plazmidhoz (12. azonosítószámú szekvencia; 3. ábra) ligáltuk. A reakciót T4-ligáz (Boehringer) alkalmazásával, a forgalmazó útmutatásai szerint végeztük. A ligálási mintában lévő DNS-t etanollal precipitáltuk és 10  $\mu$ L vízben oldottuk, majd ezzel *E. coli* DH5 $\alpha$ -F'-sejteket transzformáltunk. Restrikciós enzimes analízist követően kiválasztottunk egy pozitív klónt, és az ennek megfelelő plazmidot pFPMT-CL-E2-H6-nak (32. azonosítószámú szekvencia, 14. ábra) neveztük el.

#### 5. példa

#### 15 pFPMT-CL-K-H6-E1 ingázóvektor előállítása

Ezt az ingázóvektort két lépésben állítottuk elő.

Az első lépésben a pUC18-FMD-CL-H6-K-E1-H6 konstrukciót helyspecifikus mutagenézis alkalmazásával hoztuk létre, melynek során templátként a pUC18-FMD-CL-E1-H6-plazmidot (20. azonosítószámú szekvencia, 7. ábra) használtuk. Láncindító-párként a következő oligonukleotidokat alkalmaztuk:

H6K-hin-neu: 5'-catcacaaatatgaggtgcgcaacgtgtccgggatgtac-3' (37. azonosítószámú szekvencia);

H6KRK-her-neu: 5'-gtgatggtggtgtcctagtgtgctagtggtaggaagcatag-3' (38. azonosítószámú szekvencia).

25 (A további kodonok beépítését eredményező bázisokat aláhúzással jelöltük.

A polimeráz láncreakcióhoz alkalmazott reakcióelegy összetétele a következő volt: pUC18-FMD-CL-E1-H6 (2 ng/ $\mu$ L, 1  $\mu$ L); H6K-hin-neu-láncindító (100  $\mu$ M, 2  $\mu$ L); H6KRK-her-neu-láncindító (100  $\mu$ M, 2  $\mu$ L); dNTP-k (mindegyik 2,5 mM koncentrációban, 8  $\mu$ L); víz (76  $\mu$ L); 10-szeres koncentrációjú puffer-2 (Expand Long Template PCR System, Boehringer, katalógusszám: 1681 834; 10  $\mu$ L); Expand Long Template PCR System polimeráz-elegy (1 egység/ $\mu$ L, 0,75  $\mu$ L).

A polimeráz láncreakciót a következő lépésekből álló program szerint hajtottuk végre:

1. denaturálás 95 °C-on, 15 percig;
2. inkubálás 35 ciklusban; ciklusonként 95 °C-on 30 másodperces denaturálással, 60 °C-on egy
- 5 perces hibridizáltatással, és 72 °C-on 5 perces lánchosszabbítással;
3. termináció 4 °C-on.

A PCR-minta egy alikvotját 1 %-os agarózgélen végzett gélelektroforézissel analizáltuk, a PCR-termék méretét (kb. 4,2 kb) megfelőnek találtuk. Ezt követően a PCR-termék 3'-A túlnyúlásait T4-polimerázzal eltávolítottuk, miáltal 3'- és 5'-OH csoportokat tartalmazó tompa

10 végeket kaptunk. Ennek során a PCR-reakcióelegy maradék 95 µL-éhez 1 µL T4-polimeráz-oldatot (Boehringer; 1 egység/µL) és dNTP-k (mindegyik 2,5 mM koncentrációban) elegyét (4 µL) adtuk, majd a mintát 37 °C-on 20 percig inkubáltuk. Ezt követően a mintában lévő DNS-t etanollal precipitáltuk és 16 µL vízben feloldottuk.

Ezután a tompa végű PCR-termékhez kinázreakcióval 5'-végi foszfátcsoportokat kapcsol-

15 csoltunk. Ennek során a tompa végű PCR-termék 16 µL térfogatú oldatához 1 µL T4-polinukleotid-kináz oldatot (Boehringer; 1 egység/µL), 2 µL tízszeres koncentrációjú T4-polinukleotid-kináz reakciópuffert (Boehringer) és 1 µL ATP-oldatot (10 mM) adtunk, majd a mintát 37 °C-on 30 percig inkubáltuk.

Ezt követően a DNS-t 1 %-os agarózgélen elválasztottuk, és a gélről a kívánt termék-

20 nek megfelelő csíkot gélextrakciós reagenskészlet (Qiagen) alkalmazásával, a forgalmazó útmutatásai szerint izoláltuk. A tisztított termék 50 ng-ját T4-ligáz (Boehringer) alkalmazásával, a forgalmazó útmutatásai szerint, önligálásnak vetettük alá. 16 °C-on végzett 72 órás inkubálást követően a ligálási elegyben lévő DNS-t etanollal precipitáltuk és 10 µL vízben feloldottuk (ligálási minta).

25 A ligálási minta 5 µL-ével *E. coli* DH5αF'-sejteket transzformáltunk. Több ampicillin-rezisztens klónt plazmid-DNS-ük restrikciós enzim emésztésével karakterizáltunk, egy pozitív klónt megtartottunk, és az ennek megfelelő plazmidot pUC18-FMD-CL-H6-E1-K-H6-nak (39. azonosítószámú szekvencia, 17. ábra).

Második lépésként a hordozóvektort két fragmens ligálásával hoztuk létre, melynek

30 során „ragadós” BclI-végeket alkalmaztunk. Mivel a BclI-enzim felismerési helyénél csak metilálatlan DNS-en képes hasítani, *E. coli* dam<sup>-</sup> törzset a pUC18-FMD-CL-H6-K-E1-H6-plazmiddal (39. azonosítószámú szekvencia, 17. ábra) és a pFPMT-CL-E1-plazmiddal (36.



követően a második stabilizálási lépésből származó tenyészetek alikvotjait szelektív YNB/agarlemezre szélesztettük, és a lemezeket négy napig inkubáltuk, míg makroszkóposan látható telepek nem jelentek meg. Törzsként jól definiálható, különálló telepet tekintettünk, melyet a későbbi expressziós analízisre használtunk.

5 Az expressziós analízist kisléptékű rázatólombikos tenyésztéssel végeztük. A fenti YNB/agarlemezzől levett telepet 2 mL YPD-tápközegbe helyeztük, és a fentebb leírtak szerint 48 órán át inkubáltuk. Ezt a 2 mL-es alikvotot 20 mL térfogatú rázólombikos tenyészet oltótenyészeteként alkalmaztuk. Tápközegként „YPGlycerol”-t (1 %) alkalmaztunk, és a rázatólombikot 37 °C-on, rotációs rázógépen (200-as percenkénti fordulatszámmal keverve) inkubáltuk.

10 48 órás tenyésztést követően a tenyészethez – az expressziós kazetta indukálása céljából – 1 % metanolt adtunk, majd különböző időközönként 1 mL-es alikvotokban sejtüledékeket gyűjtöttünk, melyeket további analízis céljából –20 °C-on tároltunk. A specifikus proteintermelődést SDS-PAGE és Western-blot analízissel vizsgáltuk. Ehhez a sejtüledékeket mintafelvevő pufferben (Tris-HCl/SDS) szolubilizáltuk, és 95 °C-on 15 percnél hosszabb ideig inkubáltuk.

15 proteinek 15 %-os poliakrilamid-gélen elválasztottuk, majd nitrocellulóz-membránra másoltuk (nedves módszerrel, hidrogén-karbonát-puffer alkalmazásával). A foltokat, első antitestként, specifikus egérezetű anti-E1 antitest (IGH 201) vagy egérezetű anti-E2 antitest (IGH 216, ld. a WO 96/04385 számú nemzetközi közzétételi iratot), második antitestként pedig nyúlerezetű anti-egér-AP antitest alkalmazásával hívtuk elő. A festést NBT-BCIP-vel végeztük.

20 A pozitív törzseket további vizsgálat céljára megtartottuk.

E pozitív klónok közül ötöt rázatólombikos expressziós kísérletben használtunk fel. Az YNB-lemezről levettük a megfelelő törzs egy telepét, és ezzel 2 mL YPD-tápközegbe oltottunk be. A tenyészeteket a fentebb leírtak szerint inkubáltuk. A kapott sejtszuszpenzióval 500 mL-es rázatólombikban, 100 mL térfogatú YPD-tápközegben egy második oltótenyészetet

25 készítettünk. Ezt a lombikot rotációs rázógépen (200-as percenkénti fordulatszámmal keverve) 37 °C-on 48 óra hosszat inkubáltuk, majd a kapott oltótenyészet 25 mL-es alikvotjával 250 mL YPGlycerol (1 %) tápközegbe oltottunk be, majd ezt terelőlemezzel ellátott kétliteres rázatólombikban, a fentebb leírt feltételek mellett inkubáltuk. A tenyészethez a beoltás után 48 órával (promóter-indukció céljából) 1 % metanolt adtunk, és a rázatólombikokat a fenti felté-

30 telekkel tovább inkubáltuk. Az indukciót követően 24 órával a kísérletet leállítottuk és a sejtüledéket centrifugálással összegyűjtöttük. Az öt különböző klón expressziós szintjét SDS-PAGE/Western-blot analízissel (a fentebb leírt feltételekkel) vizsgáltuk. Az egyes klónok titrá-

lási sorozatát gélre vittük, és a további fermentációs és tisztítási kísérletekhez a legnagyobb termelékenységű törzseket választottuk ki.

A *H. polymorpha*, amely a *Pichia pastoris* közeli rokonságába tartozó élesztőtörzs [Gellissen (2000)], meglepő módon, a HCV-proteineket lényegében hiperglikoziláció nélkül képes termelni, mely proteinek mérete - cukormolekulákkal együtt - a HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sejtek által termelt HCV-burokproteinéhez hasonló.

A *Hansenula polymorpha* RB11-törzset a Budapesti Szerződésnek megfelelően, 2002. április 19-én az MUCL-nél (Mycotheque de l'UCL, Université Catholique de Louvain, Laboratoire de mycologie, Place Croix du Sud 3 bte 6, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium), MUCL43805 nyilvántartási számon helyeztük letétbe.

### 7. példa

#### pSY1aMFE1sH6a-vektor előállítás

A *S. cerevisiae* expressziós plazmidot a következő szerint állítottuk elő. A pGEMT-E1sH6-vektorból (6. azonosítószámú szekvencia, 1. ábra) NsiI/Eco52I-fragmensként (melyet T4-DNS-polimeráz alkalmazásával tompa végűvé alakítottunk) E1-kódolószekvenciát izoláltunk, és azt T4-DNS-ligáz (Boehringer) alkalmazásával, a forgalmazó útmutatásai szerint, pYIG5-vektorba (41. azonosítószámú szekvencia, 19. ábra) klónoztuk. A klónozást úgy hajtottuk végre, hogy az E1s-H6 kódolófragmense közvetlenül – és azonos leolvasási fázisban – az  $\alpha$ MF kódolószekvenciájához kapcsolódjon. A ligálási eleggyel *E. coli* DH5 $\alpha$ F'-sejteket transzformáltunk, majd több ampicillin-rezisztens klón plazmid-DNS-ét restriktációs enzimesszel emésztéssel analizáltuk, és egy pozitív klónt megtartottunk, melyet pYIG5E1H6-nak (ICCG3470; 42. azonosítószámú szekvencia, 20. ábra) neveztünk el.

Az  $\alpha$ MF-szekvenciát és az E1s-kódoló régiót His-toldalékkal együtt tartalmazó expressziós kazettát – a pYIG5E1H6-plazmid 2790 bázispáros BamHI-fragmensként – BamHI-lyel emésztett *E. coli*/*S. cerevisiae* pSY1-ingázóvektorba (21. azonosítószámú szekvencia, 43. ábra) ligáltuk. A ligálást T4-DNS-ligáz (Boehringer) alkalmazásával, a forgalmazó útmutatásai szerint hajtottuk végre. A ligálási eleggyel *E. coli* DH5 $\alpha$ F'-sejteket transzformáltunk, majd több ampicillin-rezisztens klón plazmid-DNS-ét restriktációs enzimesszel analizáltuk, és egy pozitív klónt megtartottunk, melyet pSY1aMFE1sH6a-nak (ICCG3479; 44. azonosítószámú szekvencia, 22. ábra) neveztünk el.

*8. példa*

### pSYIGSE2H6-vektor előállítása

A pSYYGSE2H6 *S. cerevisiae* expressziós plazmidot a következők szerint állítottuk elő. A pBSK-E2sH6-vektorból (45. azonosítószámú szekvencia, 23. ábra), Sall/KpnI-frag-  
5 mensként (melyet T4-DNS-polimeráz alkalmazásával tompa végűvé alakítottunk) E2-kódoló-  
szekvenciát izoláltunk, és azt T4-DNS-ligáz (Boehringer) alkalmazásával, a forgalmazó útmu-  
tatásai szerint, pYIG5-vektorba (41. azonosítószámú szekvencia, 19. ábra) klónoztuk. A kló-  
nozást úgy hajtottuk végre, hogy az E2s-H6 kódolófragmense közvetlenül – és azonos leolva-  
sási fázisban – az  $\alpha$ MF kódolószekvenciájához kapcsolódjon. A ligálási eleggyel *E. coli*  
10 DH5 $\alpha$ F'-sejteket transzformáltunk, majd több ampicillin-rezisztens klón plazmid-DNS-ét rest-  
riktációs enzimessal emésztéssel analizáltuk, és egy pozitív klónt megtartottunk, melyet  
pYIG5HCCL-22aH6-nak (ICCG2424; 46. azonosítószámú szekvencia, 24. ábra) nevezünk el.

Az  $\alpha$ MF-szekvenciát és az E2(384-673)-kódoló régiót His-toldalékkal együtt tartalmazó expressziós kazettát – a pYIG5HCCL-22aH6-plazmid 3281 bázispáros BamHI-  
15 fragmenseként – BamHI-gyel hasított *E. coli*/S. *cerevisiae* pSY1-ingázóvektorba (43. azonosítószámú szekvencia, 21. ábra) ligáltuk. A ligálást T4-DNS-ligáz (Boehringer) alkalmazásával, a forgalmazó útmutatásai szerint hajtottuk végre. A ligálási eleggyel *E. coli* DH5 $\alpha$ F'-sejteket transzformáltunk, majd több ampicillin-rezisztens klón plazmid-DNS-ét restriktációs enzim  
20 emésztéssel analizáltuk, és egy pozitív klónt megtartottunk, melyet pSYIGSE2H6-nak (ICCG2466; 47. azonosítószámú szekvencia, 25. ábra) neveztünk el.

*9. példa*

**pSY1YIG7E1s-vektor előállítása**

A pSY1YIG7E1s *S. cerevisiae* expressziós plazmidot a következő szerint állítottuk elő. A pGEMT-E1s-vektorból (6. azonosítószámú szekvencia, 1. ábra) NsiI/Eco52I-fragmentsként (melyet T4-DNS-polimeráz alkalmazásával tompa végűvé alakítottunk) E1-kódolószekvenciát izoláltunk, és azt T4-DNS-ligáz (Boehringer) alkalmazásával, a forgalmazó útmutatásai szerint, pYIG7-vektorba (48. azonosítószámú szekvencia, 26. ábra) klónoztuk. A klónozást úgy hajtottuk végre, hogy az E1-kódolófragments közvetlenül – és azonos leolvasási fázisban – az  $\alpha$ MF kódolószekvenciájához kapcsolódjon. A ligálási eleggyel *E. coli* DH5 $\alpha$ F'-sejteket transzformáltunk, majd több ampicillin-rezisztens klón plazmid-DNS-ét restriktions enzimesszel analizáltuk, és egy pozitív klónt megtartottunk, melyet pYIG7E1-nak (49. azonosítószámú szekvencia, 27. ábra) neveztünk el.

A CL-vezetőszekvenciát és az E1(192-326)-kódolórégiót His-toldalékkal együtt tartalmazó expressziós kazettát – a pYIG7E1-plazmid 2790 bázispáros BamHI-fragmenseként – BamHI-gyel emésztett *E. coli*/*S. cerevisiae* pSY1-ingázóvektorba (43. azonosítószámú szekvencia, 21. ábra) ligáltuk. A ligálást T4-DNS-ligáz (Boehringer) alkalmazásával, a forgalmazó útmutatásai szerint hajtottuk végre. A ligálási eleggyel *E. coli* DH5 $\alpha$ F'-sejteket transzformáltunk, majd több ampicillin-rezisztens klón plazmid-DNS-ét restrikciós enzimes emésztéssel analizáltuk, és egy pozitív klónt megtartottunk, melyet pSY1YIG7E1s-nek (50. azonosítószámú szekvencia, 28. ábra) neveztünk el.

#### 10. példa

#### 10 *Saccharomyces cerevisiae* transzformálása és a transzformánsok szelektálása

A hiperglikozilációs problémák kiküszöbölése céljából - a *Saccharomyces cerevisiae* sejtekben túlzott mennyiségben expresszált proteinek esetében gyakran leírt – mutáns-szkrinelési eljárást alkalmaztunk. A szkrinelést Ballou és mtsai. (1991) módszere alapján hajtottuk végre, miáltal spontán recesszív ortovanadát-rezisztens mutánsokat szelektáltunk. A kiindulási törzset az invertáz – nativ gélelektroforézist követően megfigyelt – glikozilációs mintázata alapján választottuk ki. A további rekombináns protein-expressziós kísérletekhez egy csökkent glikozilációs képességű törzset tartottunk vissza, melyet IYCC155-nek neveztünk el. A mutáció természetét részletesebben nem tanulmányoztuk.

Az IYCC155 glikoziláció-deficiens törzset a 7-9. példákban leírt plazmidokkal, lényegében az Elble által leírt lítium-acetátos eljárással [Elble (1992)] transzformáltuk. Szelektív YNB + 2% agar lemezről (Difco) több Ura-komplementált törzset vettünk le, és ezekkel 2 mL térfogatú YNB + 2% glükóz tápközegeket oltottunk be. A tenyészeteket rotációs rázógépen (200-as percenkénti fordulatszámmal keverve) 37 °C-on 72 óra hosszat inkubáltuk, majd a tenyészeti felülűszókat és az intracelluláris frakciókat – előhívó reagensként E1-specifikus egéreredetű monoklonális antitest (IGH 201) alkalmazásával végzett western-blot analízissel - az E1-protein termelődésére vizsgáltuk. A további kísérletekhez egy nagy termelékenységű klónt tartottunk meg.

Az általunk alkalmazott glikoziláció-deficiens *Saccharomyces cerevisiae* mutánsban a proteinek expresszióját az ilyen törzsek optimálisnál gyengébb szaporodási tulajdonságai gátolják, ami – a vad típusú *Saccharomyces cerevisiae* törzsek esetében tapasztalhatóhoz viszonyítva - kisebb biomassza-hozamot, s ezáltal a kívánt proteinek alacsonyabb kitermelését eredményezi. A kívánt proteinek kitermelése lényegesen nagyobb volt, mint az emlőseredetű sejtekben elérhető hozam.

### 11. példa

### A pPICZalpaD'E1sH6- és pPICZalphaE'E1sH6-vektor előállítása

A pPICZalphaE'Elsh6 ingázóvektort a pPICZalphaA-vektorból (Invitrogen; 51. azonosítószámú szekvencia, 29. ábra) kiindulva hoztuk létre. Első lépésként a kiindulási vektort úgy módosítottuk, hogy lehetővé tegyük az E1-kódolószekvencia - közvetlenül a KEX2, illetve STE13 „processing” proteáz hasítási helye mögé történő – klónozását. Ennek során a pPICZalphaA-vektort XhoI- és NotI-endonukleázzal emésztettük, majd az emésztményt 1 %-os agarózgélben elválasztottuk, és a 3519 kb-os fragmenst (azaz a vektor nagyobb részletét) gélextrakciós reagenskészlet (Qiagen) alkalmazásával izoláltuk és tisztítottuk. A kapott 10 fragmenst T4-polimeráz (Boehringer) alkalmazásával, a pPICZalphaD'-vektort (52. azonosítószámú szekvencia, 30. ábra), illetve a pPICZalphaE'-vektort (53. azonosítószámú szekvencia, 31. ábra) eredményező, specifikus oligonukleotidok jelenlétében, a forgalmazó által megadott feltételekkel ligáltuk.

A következő oligonukleotidokat alkalmaztuk:

15 - a pPICZalphaD'-vektor előállításához:

8822: 5'-TCGAGAAAAGGGGCCCCGAATTCGCATGC-3' (54. azonosítószámú szekvencia);  
és

8823: 5'-GGCCGCATGCGAATTCGGGCCCCTTTTC-3' (55. azonosítószámú szekvencia), amelyek, hibridizálást követően, a következő kapcsoló-oligonukleotidot eredményezik:

20 TCGAGAAAAGGGGCCCGAATTCGCATGC (54. azonosítószámú szekv.)

CTTTTCCCCGGGCTTAAGCGTACGCCGG (55. azonosítós. szekv.);

- a pPICZalphaE'-vektor előállításához:

8649: 5'-TCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCCTGCAGCATATGC-3' (56. azonosítószámú szekvencia):

25 8650: 5'-GGCCGCATATGCTGCAGGCTTCAGCCTCTCTTTTC-3' (57. azonosítószámú szekvencia).

amelyek, hibridizálást követően, a következő kapcsoló-oligonukleotidot eredményezik:

TCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCCTGCAGCATATGC (56. azon. szekv.)

CTTTTCTCTCCGACTTCGGACGTCGTATACGCCGG (57. azon. szekv.).

30 A létrehozott pPICZalphaD', illetve pPICZalphaE' ingázóvektor közvetlenül a KEX2, illetve STE13 „processing” proteáz hasítási helye mögé újonnan beépített klónozóhelyeket tartalmaz. Az E1-H6-kódolószekvenciát a pGEMT-E1sH6-plazmidből (6. azonosítószámú szekvencia, 1. ábra) NsiI/Eco52I-fragmentsként izoláltuk. Ezt a fragmenst az emésztmény 1

%-os agarózgélen végzett elválasztását követően, gélextrakciós reagenskészlet (Qiagen) alkalmazásával tisztítottuk. A kapott fragmenst T4-DNS-polimerázzal tompa végűvé alakítottuk, majd a pPICZalphaD'-, illetve pPICZalphaE'-vektorba – közvetlenül a megfelelő „processing” proteáz hasítási helye mögé – ligáltuk.

5 A ligálási elegyekkel *E. coli* TOP10F'-sejteket transzformáltunk, és több zeocin-rezisztens telepből kinyert plazmid-DNS-t restrikciós enzimes emésztéssel analizáltunk. Pozitív klónokat tartottunk meg, melyeket pPICZalphaD'E1sH6-nak (ICCG3694; 58. azonosítószámú szekvencia, 32. ábra), illetve pPICZalphaE'E1sH6-nak (ICCG3475; 59. azonosítószámú szekvencia, 33. ábra) neveztünk el.

## 10 12. példa

### pPICZalphaD'E2sH6- és pPICZalphaE'E2sH6-vektor előállítása

A pPICZalphaD'- és pPICZalphaE'-vektort a 11. példában leírtak szerint állítottuk elő.

15 Az E2-H6-kódolószekvenciát a pBSK-E2sH6-plazmidből (45. azonosítószámú szekvencia, 23. ábra), SalI/KpnI-fragmensként izoláltuk. Ezt a fragmenst az emésztmény 1 %-os agarózgélen végzett elválasztását követően, gélextrakciós reagenskészlet (Qiagen) alkalmazásával tisztítottuk. A kapott fragmenst T4-DNS-polimerázzal tompa végűvé alakítottuk, majd a pPICZalphaD'-, illetve pPICZalphaE'-vektorba – közvetlenül a megfelelő „processing” proteáz hasítási helye mögé – ligáltuk.

20 A ligálási eleggyel *E. coli* TOP10F'-sejteket transzformáltunk, és több zeocin-rezisztens telepből kinyert plazmid-DNS-t restrikciós enzimes emésztéssel analizáltunk. Pozitív klónokat tartottunk meg, melyeket pPICZalphaD'E2sH6-nak (ICCG3692; 60. azonosítószámú szekvencia, 34. ábra), illetve pPICZalphaE'E2sH6-nak (ICCG3476; 61. azonosítószámú szekvencia, 35. ábra) neveztünk el.

## 25 13. példa

### *Pichia pastoris* transzformálása és a transzformánsok szelektálása

A 11. és 12. példában leírt *Pichia pastoris* ingázóplazmidokkal *P. pastoris* sejteket transzformáltunk [a forgalmazó (Invitrogen) által megadott feltételek szerint]. További karakterizálás céljára egy E1- és egy E2-termelő törzset tartottunk meg.

30 A HCV-burokproteineket *Pichia pastoris*-ban expresszáltattuk, mely élesztőtörzsről ismert, hogy sejteikből normális esetben hiányzik a hiperglikoziláció [Gellissen (2000)], és amelyet korábban dengue-vírus E-proteinjének – GST-füziós proteinként történő - expresszáltatására alkalmaztak [Sugrue és mtsai. (1997)]. Lényeges, hogy a *P. pastoris* által expresszált HCV-

burokproteinek glikozilációs mintázata hasonló volt a vad típusú *Saccharomyces* törzsek által termelt HCV-burokproteinekéhez. Közelebbről, a *P. pastoris* által termelt HCV-burokproteinek – ahogy a transzformált *P. pastoris* sejtekből izolált proteinek western-blot analízisével detektált expressziós termékek molekulatömege alapján megállapítható – hiperglikoziláltak.

#### 5 14. példa

*Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* és *Pichia pastoris* tenyésztésének feltételei

*Saccharomyces cerevisiae*

##### Sejtbankok létrehozása

10 A szelektált rekombináns klónból egy eredeti sejtbankot és egy munka sejtbankot hoztunk létre.

Közepes exponenciális szaporodási stádiumig tenyésztett rázatólombikos tenyészetből (amelynek inkubálási feltételei megegyeztek az alábbiakban leírásra kerülő fermentációs oltótenyészetével) fagyasztott fiolákat készítettünk, melyekhez krioprotektánsként (50 %-os végkoncentrációban) glicerint adtunk.

#### 15 Fermentáció

Az oltótenyészeteket a fagyasztott munka sejtbankból indítottuk be, és kétliteres Erlenmeyer rázatólombikokban 500 mL – 2 % szacharózzal kiegészített – YNB-tápközegben (Difco), 200-as percenkénti fordulatszámmal végzett keverés közben, 37 °C-on 48 óra hosszat inkubáltuk.

20 A fermentálást rendszerint 15 liter hasznos térfogatú Biostat-C fermentorokban (B.Braun Int., Melsungen, Németország) végeztük. A fermentációs tápközeg 1 % élesztőkivonatot, 2 % peptont és – szénforrásként – 2 % szacharózt tartalmazott. Habzágátlóként polietilénlikolt alkalmaztunk.

25 A fermentáció során - az 1. táblázatban bemutatott alapértékeknek megfelelően - szabályoztuk a hőmérsékletet, pH-t és oldott oxigénkoncentrációt. Az oldott oxigén koncentrációját kaszkádvezérléssel, keverés és levegőztetés kombinálásával szabályoztuk. A pH-t 0,5 M nátrium-hidroxid oldat vagy 8,5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-oldat alkalmazásával állítottuk be.

1. táblázat

| Paraméter             | Alapérték                 |
|-----------------------|---------------------------|
| Hőmérséklet           | 33-37 °C                  |
| pH                    | 4,2-5,0                   |
| DO (növekedési fázis) | 10-40 %-os légtelítettség |
| DO (indukció)         | 0-5 %                     |
| Levegőztetés          | 0,5-1,8 vvm*              |
| Keverés               | 150-900 rpm**             |

\* térfogategyenérték/perc

5 A fermentálást 10 % oltótenyészet hozzáadásával indítottuk be. A növekedési fázis alatt a szacharóz-koncentrációt a fermentorból vett mintákban („off-line”), HPLC-analizissel (Polysphere Column OAKC Merck) ellenőriztük.

10 A növekedési fázis alatt az oldott oxigén koncentrációját kaszkádevezérléssel, keverés és levegőztetés kombinálásával szabályoztuk. A szacharóz teljes metabolizmusa után a heterológ proteintermelést az endogén termelődésű etanol szabályozta (melyet a koncentráció 0,5 % körüli értéken tartása érdekében etanol adagonkénti hozzáadásával egészítettünk ki („off-line” HPLC-analízis; Polyspher OAKC-oszlop). Az indukciós fázis alatt az oldott oxigénkoncentrációt – a levegőáramlási és keverési sebesség manuális szabályozásával - 5 %-os légtelítettség alatt tartottuk.

15 A fermentumot rendszerint az indukció után 48-72 órával, tangenciális áramlási szűrővel végzett betöményítéssel, majd a betöményített sejtuszuszenzió centrifugálásával gyűjtöttük össze. A kapott sejtlepedéket, későbbi vizsgálat céljára, -70 °C-on tároltuk.

### Hansenula polymorpha

#### Sejtbankok létrehozása

20 A szelektált rekombináns klónból egy eredeti sejtbankot és egy munka sejtbankot hoztunk létre.

Közepes exponenciális szaporodási stádiumig tenyésztett rázatólombikos tenyészetből (amelynek inkubálási feltételei megegyeztek az alábbiakban leírásra kerülő fermentációs oltótenyészetével) fagyasztott fiolákat készítettünk, melyekhez krioprotektánsként (50 %-os végkoncentrációban) glicerint adtunk.

# Fermentáció

Az oltótenyészeteket a fagyasztással (-70 °C-on) tartósított munka sejtbankból indítottuk be, és kétliteres Erlenmeyer rázatólombikokban 500 mL YPD-tápközegben (Difco), 200-as percenkénti fordulatszámmal végzett keverés közben, 37 °C-on 48 óra hosszat inkubáltuk.

A fermentálást rendszerint 15 liter hasznos térfogatú Biostat-C fermentorokban (B.Braun Int., Melsungen, Németország) végeztük. A fermentációs tápközeg 1 % élesztőkivonatot, 2 % peptont és – szénforrásként – 1 % glicerint tartalmazott. Habzásgátlóként polietilénlikolt alkalmaztunk.

A fermentáció során - a 2. táblázatban bemutatott alapértékeknek megfelelően - szabályoztuk a hőmérsékletet, pH-t és oldott oxigénkoncentrációt. Az oldott oxigén koncentrációját keveréssel szabályoztuk. A pH-t 0,5 M nátrium-hidroxid oldat vagy 8,5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-oldat alkalmazásával állítottuk be.

2. táblázat

| Paraméter    | Alapérték                 |
|--------------|---------------------------|
| Hőmérséklet  | 30-40 °C                  |
| pH           | 4,2-5,0                   |
| DO           | 10-40 %-os légtelítettség |
| Levegőztetés | 0,5-1,8 vvm*              |
| Keverés      | 150-900 rpm**             |

\* térfogategyenérték/perc

A fermentálást 10 % oltótenyészet hozzáadásával indítottuk be. A növekedési fázis alatt a glicerín-koncentrációt a fermentorból vett mintákban („off-line”), HPLC-analízissel (Polysphere Column OAKC Merck) ellenőriztük, és a glicerín teljes felhasználása után 24 órával a tenyészethez – a heterológ proteintermelés indukálása céljából - 1 % metanolt adtunk. A fermentumot az indukció után 24 órával, tangenciális áramlási szűréssel végzett betöményítéssel, majd a betöményített sejtszuszpenzió centrifugálásával gyűjtöttük össze. A kapott sejtledeket, későbbi vizsgálat céljára, -70 °C-on tároltuk.

### Pichia pastoris

A rekombináns *Pichia pastoris*-szal végzett kisléptékű proteintermelési kísérleteket rázatólombikos tenyészetekben végeztük. Az oltótenyészeteket egy éjszakán át YPD-tápközegben (Difco) inkubáltuk. A kezdeti pH-t 4,5-re korrigáltuk. A rázatólombikos tenyészeteket rotációs rázógépen 200-250-es percenkénti fordulatszámmal végzett keverés közben 37 °C-on inkubáltuk.

A kisléptékű proteintermelést kétliteres rázatólombikokban 500 mL térfogatban végeztük, és az 1 % élesztőkivonatot, 2 % Peptont (mindkettő a Difco-tól) és – szénforrásként – 2 % glicerint tartalmazó expressziós tápközeg 10 % oltótenyészzel történő beoltásával indítottuk be. Az inkubálási feltételek megegyeztek az oltótenyészetnél leírtakkal. Az indukciót a beoltás után kb. 72 órával 1 % metanol hozzáadásával végeztük. A sejteket az indukciót követően 24 órával, centrifugálással gyűjtöttük össze. A sejttöledéket, későbbi vizsgálatok céljára, -70 °C-on tároltuk.

#### 15. példa

#### A szelektált élesztősejtekben termelt MF $\alpha$ -E1-H6- és MF $\alpha$ E2-H6-protein vezetőpeptidjének eltávolítása

A HCV-E1- és HCV-E2-protein *Saccharomyces cerevisiae* „ $\alpha$ -mating” faktor ( $\alpha$ MF) vezetőszekvenciájával alkotott konstrukcióinak *Hansenula polymorpha*-ban és egy *Saccharomyces cerevisiae* glikoziláció-deficiens törzsben kapott expressziós termékeit további vizsgálatoknak vetettük alá. Mivel az 1b-genotípusú HCV-E1s-proteint (192-326. aminosavak) és HCV-E2s-proteint [383-673. aminosavak, VIEGR-szekvenciával (69. azonosítószámú szekvencia) meghosszabbítva] C-terminális His-toldalékot (H6, HHHHHH; 63. azonosítószámú szekvencia) tartalmazó proteinekként expresszáltattuk (e HCV-proteineket a továbbiakban, ebben a példában,  $\alpha$ MF-E1-H6-nak, illetve  $\alpha$ MF-E2-H6-nak nevezzük), az expresszált termékeket – élesztősejtek guanidinium-kloriddal (GuHCl) végzett szolubilizálását követően – gyors és hatékony tisztításnak vetettük alá, melyet Ni-IDA (Ni-iminodiacetsav) alkalmazásával hajtottunk végre. Röviden összefoglalva: a sejttöledékeket 6 mM GuHCl-ot tartalmazó 50 mM foszfátpufferben (pH=7,4; 9 térfogat/g sejt) újraszuszpendáltuk, majd a proteineket, 320 mM (4 % m/V) nátrium-szulfid és 65 mM (2 % m/V) nátrium-tetratiónát jelenlétében, szobahőmérsékleten egy éjszakán át szulfonáltuk. A lizátumot a fagyasztási/felolvasztási ciklust követően 4 °C-on 10000 x g-vel 30 percig végzett centrifugálással derítettük, majd a felülúszóhoz 1 % (m/V) végkoncentrációban Empigen-t (Albright & Wilson, Egyesült Királyság), 20 mM vég-

koncentrációban pedig imidazolt adtunk. A mintát 0,22 µm pórusméretű membránon leszűrtük és Ni-IDA Sepharose FF oszlopra töltöttük, melyet előzetesen 6 M GuHCl-t és 1 % Empigen-t tartalmazó 50 mM foszfátpufferrel („A” puffer; 20 mM imidazollal kiegészítve) ekvilibáltunk. Az oszlopot 20 mM, illetve 50 mM imidazolt tartalmazó „A” pufferrel mostuk, mindaddig, míg a 280 nm-nél mért abszorbancia el nem érte az alapszintet. A His-toldalékot tartalmazó termékeket „D” pufferrel [50 mM foszfát, 6M GuHCl, 0,2 % (az E1 esetében) vagy 1 % (az E2 esetében) Empigen, 200 mM imidazol] eluáltuk. Az eluált anyagokat SDS-PAGE és western-blot analízissel, E1, illetve E2 elleni specifikus monoklonális antitestek (IGH201, illetve IGH212) alkalmazásával vizsgáltuk.

Az E1-termékeket azonnal Edman-lebontással analizáltuk.

Mivel ebben a stádiumban az SDS-PAGE-analízis nagyon összetett képet adott a HCV-E2 proteincsikokról, méretszelekciós kromatográfiával további frakcionálást végeztünk. Az Ni-IDA eluátumot ultraszűréssel (Centriplus, Amicon, Millipore; molekulatömeg-áteresztési határ: 10 kD) betöményítettük, és 1 % Empigen-t tartalmazó foszfátpufferelt sóoldatban vagy 3 % Empigen-t tartalmazó foszfátpufferelt sóoldatban Superdex G200 oszlopra (10/30 vagy 16/60; Pharmacia) töltöttük. A kb. 80 kD és kb. 45 kD közötti molekulatömegű E2-termékeket tartalmazó eluátum-frakciókat [azaz a 37. ábrán bemutatott elúciós görbe 17-23. frakcióit, melyeket az SDS-PAGE analízissel meghatározott migráció (ld. 38. ábra) alapján választottunk ki] összeöntöttük és alkilezési reakciónak vetettük alá (szobahőmérsékleten három órás inkubálás 10 mM DTT-vel, majd szobahőmérsékleten három órás inkubálás 30 mM jó-d-acetamiddal. Az N-terminális szekvenálásra szánt mintákat Endo-H-val (Roche Biochemicals) kezeltük vagy kezelés nélkül hagytuk. A glikozilált és deglikozilált E2-termékeket, N-terminális szekvenálás céljából, PVDF-membránokra vittük fel. A glikozilált és deglikozilált E2 amido-feketével festett blot-ját a 39. ábrán mutatjuk be.

A tisztított E1- és E2-termékek szekvenálása azt a csalódást keltő eredményt hozta, hogy a HCV-burokproteinekről a szignálszekvencia eltávolítása csak részlegesen következik be (ld. a 3. táblázatot). Ezen túlmenően, a melléktermékek (bomlástermékek és a továbbra is vezetőszekvenciát tartalmazó termékek vagy részleteik) többsége glikozilált. Ez a glikoziláció, még ha részben is, a szignálszekvencia nem hasított fragmensében helyezkedik el, amely szintén tartalmaz N-glikozilációs helyet. Ezek a helyek a kevésbé glikozilált melléktermékek létrejötte céljából mutagenizálhatók. Mindazonáltal, még nagyobb problémát jelent az a felismerés, hogy néhány alternatív hasítású termék csak 1-4 aminosavban tér el a kívánt, intakt burokproteintől, így a megfelelő, érett termék tisztítása – a különböző expressziós termékek közötti

megkülönböztethető biokémiai tulajdonságok hiánya miatt – gyakorlatilag lehetetlen. Bizonyos bomlástermékek Kex-2-szerű hasítás eredményeként jöhetnek létre (például, az E1 196. aminosava utáni hasítás, amely arginin utáni hasítást jelent), ami az  $\alpha$ -„mating” faktor vezetőszekvencia lehasításához is szükséges, így ez - e kulcsfontosságú lépést zavarása nélkül - nem blokkolható.

A *Saccharomyces cerevisiae* IYCC155-törzs pSY1YIG7E1s-vektorral (50. azonosítószámú szekvencia, 28. ábra) végzett transzformálásával kapott, nagy E1-termelékenységgű klónt a *Saccharomyces cerevisiae* IYCC155-törzs pSY1aMFE1sH6aYIG1E1s-vektorral (44. azonosítószámú szekvencia, 22. ábra) végzett transzformálásából származó, nagy termelékenységgű klónnal hasonlítottuk össze. Az E1-protein intracelluláris expresszióját az indukciót követően 2-7 nappal – E1-specifikus monoklonális antitest (IGH201) alkalmazásával végzett western-blot analízissel – értékeltük. Ahogy a 40. ábrán látható, maximális mértékű expressziót mindkét törzsnél két nap után figyeltünk meg, de a két törzs expressziós mintázata teljesen eltérő volt. Az  $\alpha$ -„mating” faktor vezetőszekvenciájával együttes expresszió a csíkok nagyon összetett mintázatát eredményezi, ami annak köszönhető, hogy a vezetőszekvencia lehasítása nem hatékony – ez több expressziós termék kialakulásához vezet, melyek N-terminális végei különbözőek, s amelyek közül néhány 1-5 N-glikozilációval van módosítva. Mindazonáltal, a CL-vezetőszekvenciával expresszált E1-proteinek esetében kevesebb elkülöníthető csík figyelhető meg, ami a CL-vezetőszekvencia megfelelő lehasításának nagy előfordulási arányát, illetve azt a tényt tükrözi, hogy a megfelelő érési folyamaton átesett anyag N-glikozilációval (1-5 lánc) lehet módosítva, ahogy az ugyanezen CL-vezetőszekvenciával együtt expresszálatott *Hansenula*-eredetű E1 esetében megfigyelhető (ld. a 16. példát).

Az E1 elleni monoklonális antitestet (IGH201) termelő hibridóma-sejtvonalat a Budapesti Szerződés értelmében, 1998. március 12-én, ECACC 98031216 nyilvántartási számon, az Európai Sejttenyésztési Gyűjteménynél (European Collection of Cell Cultures, Centre for Applied Microbiology & Research, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Egyesült Királyság) helyeztük letétbe. Az E2 elleni monoklonális antitestet (IGH212), 12D11F2 néven, a WO 96/04385 számú nemzetközi közzétételi iratban (7.4 példa) Maertens és mtsai. írták le.

3. táblázat

Saccharomyces cerevisiae-ben vagy Hansenula polymorpha-ban expresszálatott  $\alpha$ MF-E1-H6- és  $\alpha$ MF-E2-H6-protein N-terminálisának azonosítása

5 [N-terminális szekvenálás alapján megbecsülhető az érett E1-H6- és E2-H6-protein N-terminálisainak mennyisége (az „érett” kifejezés az  $\alpha$ MF-szignálszekvencia pontos eltávolításával kapott proteinre vonatkozik). A proteintermékek összes mennyiségét az Edman-lebontással kapott csúcsok intenzitása alapján, pmol protein egységekben számítottuk ki, majd az egyes specifikus proteinekre (azaz minden egyes „detektált N-terminálisra”) megbecsültük az összmennyiségre vonatkoztatott mol%-ot.]

| Élesztő              | $\alpha$ MF-E1-H6                                                                                                                                                                                                                                                                                     | $\alpha$ MF-E2-VIEGR-H6                                                                                                                          |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>S. cerevisiae</i> | <u>1. kísérlet:</u><br>- a proteinek 16 %-a továbbra is tartalmaz $\alpha$ MF-szekvenciát;<br>- a proteinek 18 %-a az E1 195. és 196. aminosava között van hasítva<br>- a proteinek 66 %-ából az $\alpha$ MF-szekvencia pontosan van lehasítva;                                                       | /                                                                                                                                                |
| Élesztő              | $\alpha$ MF-E1-H6                                                                                                                                                                                                                                                                                     | $\alpha$ MF-E2-VIEGR-H6                                                                                                                          |
| <i>S. cerevisiae</i> | <u>2. kísérlet:</u><br>- a proteinek 18 %-a továbbra is tartalmaz $\alpha$ MF-szekvenciát;<br>- a proteinek 33 %-a az E1 195. és 196. aminosava között van hasítva<br>- egyéb proteinek 8 %-a egyéb E1 hasítási termékek<br>- a proteinek 44 %-ából az $\alpha$ MF-szekvencia pontosan van lehasítva; | /                                                                                                                                                |
| <i>H. polymorpha</i> | - a proteinek 64 %-a továbbra is tartalmaz $\alpha$ MF-szekvenciát;<br>- a proteinek 6 %-a az E1 192. és 193. aminosava között van hasítva<br>- a proteinek 30 %-ából az $\alpha$ MF-szekvencia pontosan van lehasítva;                                                                               | - a proteinek 75 %-a továbbra is tartalmaz $\alpha$ MF-szekvenciát;<br>- a proteinek 25 %-ából az $\alpha$ MF-szekvencia pontosan van lehasítva; |

16. példa

E1-konstrukció expresszáltatása nagy volumenű termeltetésre és tisztításra alkalmas élesztőben

- A *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ MF-vezetőpeptidjének helyettesítésére több egyéb vezetőszekvenciát alkalmaztunk, mint például a CHH-t (*Carcinus meanas* hiperglikémia hormonjának vezetőszekvenciája), Amy1-et (*S. occidentalis* amiláz vezetőszekvenciája), Gam1-et (*S. occidentalis*-ből származó glükóamiláz vezetőszekvenciája), Phy5-öt (gombaeredetű fitáz vezetőszekvencia), pho1-et (*Pichia pastoris* sav foszfátázának vezetőszekvenciája), illetve CL-t [madáreredetű lizozim-C (1,4-béta-N-acetilmuramidáz-C) vezetőszekvenciája, és ezeket az E1-H6-proteinhez (azaz C-terminális His-toldalékot tartalmazó E1-proteinhez) kapcsoltuk.
- 10 Valamennyi konstrukciót *Hansenula polymorpha* sejtekben expresszáltattuk, és a sejtlyázátumokat western-blot analízisnek vetettük alá. A kapott eredmények alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a peptid vezető- vagy szignálszekvenciája lehasításának aránya rendkívül alacsony volt, kivéve azt a konstrukciót, amelyben vezetőpeptidként a CL-t alkalmaztuk. Ezt a CHH-E1-H6-konstrukció esetében a Ni-IDA-oszlopon tisztított anyag Edman-lebontásával
- 15 igazoltuk: annak ellenére, hogy több különböző szekvenciát kaptunk, megfelelően hasított termék nem volt kimutatható (ld. a 4. táblázatot).

4. táblázat

H. polymorpha-ban expresszáltatott CHH-E1-H6-proteinek N-terminálisaink azonosítása az SDS-PAGE gélelektroforézissel végzett elválasztást és PVDF-membránra történő átmásolást követően kapott különféle proteincsíkok N-terminális szekvenálása alapján

| Molekulatömeg | N-terminálisok azonosítása                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 45 kD         | a CHH-vezetőszekvencia 27. aminosavánál kezdődik, vagyis csak a pre-szekvencia került lehasításra, a pro-szekvencia a proteinhez kapcsolva maradt                                                                                                                  |
| 26 kD         | - részben a CHH-vezetőszekvencia 1. aminosavánál kezdődik, vagyis a pre-pro-szekvencia nem került eltávolításra;<br>- részben a CHH-vezetőszekvencia 9. aminosavánál kezdődik, azaz egy második „AUG” kodonnál kezdődő bekövetkező alternatív transzláció terméke; |
| 24 kD         | - részben a CHH-vezetőszekvencia 1. aminosavánál kezdődik, vagyis a pre-pro-szekvencia nem került eltávolításra;<br>- részben a CHH-vezetőszekvencia 9. aminosavánál kezdődik, azaz egy második „AUG” kodonnál kezdődő bekövetkező alternatív transzláció terméke; |

5

Ahogy korábban már említettük, a sejtizátumok western-blot analízise E1-specifikus proteincsíkok mintázatát mutatta, ami a CL-vezetőpeptid nagyobb arányú pontos eltávolítására utal. Ez meglepő, mivel a CL-vezetőpeptid nem élesztőből származik. A GuHCl-dal szolubilizált és Ni-IDA-oszlopon tisztított anyag Edman-lebontással végzett aminosav-szekvenálásával igazoltuk, hogy az E1-proteinek 84 %-a pontosan van hasítva, és az anyag lényegében mentes a bomlástermékektől. A maradék 16 % továbbra is „éretlen”, de – mivel nem glikozilált – könnyen eltávolítható az elegyből, ami lehetővé teszi a pontosan hasított és glikozilált E1 specifikus feldúsítását. Az ilyen dúsítási módszerek példái közé tartozik a lektinek alkalmazásával végzett affinitási kromatográfia (további lehetőségeket illetően ld. a 19. példát). Más módon, a nem glikozilált anyag nagyobb hidrofóbitása felhasználható a feldúsítási eljárás kiválasztására és optimalizálására. A CL-E1-H6-proteinről a CL-vezetőpeptid pontos eltávolítását tömegspektrometriával is igazoltuk, melynek eredménye szintén azt bizonyította, hogy az 1b-genotípusú E1s-protein öt N-glikozilációs helyéből akár négy foglalt lehet, így az „NNSS” szekvencia (233-236. aminosavak; 73. azonosítószámú szekvencia egyedüli N-

10

15

glikozilációs helynek tekinthető.

17. példa

Hansenula polymorpha-ban CL-E2-H6-ot kódoló konstrukcióval expresszáltatott HCV-E2-protein tisztítása és biokémiai karakterizálása

5 A CL-vezetőpeptid *Hansenula polymorpha*-ban expresszáltatott CL-E2-VIEGR-H6-proteinről (a továbbiakban, e példában, „CL-E2-H6”) történő lehasítása hatékonyságát vizsgáltuk. Mivel a HCV-E2s-t (383-673. aminosavak) His-toldalékot tartalmazó proteinként expresszáltattuk, e protein gyors és hatékony tisztítását - a sejtek GuHCl alkalmazásával végzett szolubilizálását követően - Ni-IDA-oszlopon hajtottuk végre. Röviden összefoglalva: a

10 sejttöledékeket 6 M GuHCl-ot tartalmazó 30 mM foszfátpufferben (pH=7,2; 9 mL puffer/g sejt) úraszuszpendáltuk. A proteint 320 mM (4 % m/V) nátrium-szulfid és 65 mM (2 % m/V) nátrium-tetratiónt jelenlétében, szobahőmérsékleten egy éjszakán át szulfonáltuk. A lizátumot a fagyasztási/felolvasztási ciklust követően 4 °C-on 10000 x g-vel 30 percig végzett centrifugálással derítettük, majd a felülúszóhoz 1 % (m/V) végkoncentrációban Empigen-BB-t (Albright

15 & Wilson, Egyesült Királyság), 20 mM végkoncentrációban pedig imidazolt adtunk. A további kromatográfiás lépéseket Akta FPLC munkaállomáson (Pharmacia) hajtottuk végre. A mintát 0,22 µm pórusméretű (cellulóz-acetát) membránon leszűrtük és Ni-IDA (Ni<sup>2+</sup>-kal feltöltött Chelating Sepharose FF oszlop; Pharmacia), melyet előzetesen 20 mM imidazollal kiegészített „A” pufferrel [6 M GuHCl-ot és 1 % Empigen-BB-t tartalmazó, 50 mM foszfátpuffer

20 (pH=7,2)] ekvibráltunk. Az oszlopot, egymást követően, 20 mM, illetve 50 mM imidazolt tartalmazó „A” pufferrel mostuk, mindaddig, míg a 280 nm-nél mért abszorbancia el nem érte az alapszintet. A His-toldalékot tartalmazó termékeket „D” pufferrel [50 mM foszfát, 6M GuHCl, 0,2 % Empigen-BB (pH=7,2), 200 mM imidazol] eluáltuk. Az eluált anyagokat SDS-PAGE és western-blot analízissel - E2 elleni specifikus monoklonális antitestek (IGH212) alkalmazásával – vizsgáltuk (41. ábra). Az IMAC-tisztított E2-H6-proteint Edman-lebontással

25 N-terminális szekvenálásnak vetettük alá. Ennek során a proteineket 3 % Empigen-BB-t tartalmazó foszfátpufferelt sóoldatban 37 °C-on N-glikozidázzal (Roche; 0,2 egység/µg E2) egy óra hosszát inkubáltuk vagy kezelés nélkül hagytuk. A glikozilált és deglikozilált E2-H6-proteineket SDS-PAGE-gélelektroforézisnek vetettük alá, és aminosav-szekvenálás céljából

30 PVDF-membránra másoltuk. Az analízist PROCISE™ 492 proteinszekvenáló készülék (Applied Biosystems) alkalmazásával végeztük. Mivel ebben a stádiumban az SDS-PAGE bomlástermékek jelenlétét mutatta, méretszelekciós kromatográfiával további frakcionálást vé-

geztünk. Az Ni-IDA-oszlopról kapott eluátumot ultraszűrőssel (Centriplus, Amicon, Millipore; molekulatömeg-áteresztési határ: 10 kD) betöményítettük, és 1 % Empigen-BB-t tartalmazó foszfátpufferelt sóoldatban Superdex G200 oszlopra (Pharmacia) töltöttük. A kb. 30 kD és kb. 70 kD közötti molekulatömegű E2s-szerű termékeket tartalmazó eluátum-frakciókat (melyeket az SDS-PAGE analízissel meghatározott migráció alapján választottunk ki) összeöntöttük és alkilezési reakciónak vetettük alá (37 °C-on 30 perces inkubálás 5 mM DTT-vel, majd 37 °C-on 30 perces inkubálás 20 mM jód-acetammiddal). Ilyenformán, a bomlástermékek IMAC-tisztítás utáni esetleges jelenléte az intakt termék további frakcionálásával (például, méreletszelekciós kromatográfia alkalmazásával) kiküszöbölhető. Mindezek eredményeként, várakozáson felüli, jó eredményt kaptunk. Az N-terminális szekvenálás alapján megbecsülhető azon E2-termék mennyisége, amelyből a CL-vezetőpeptid eltávolításra került. A proteintermékek összes mennyiségét az Edman-lebontással kapott csúcsok intenzitása alapján, pmol protein egységekben számítottuk ki, majd az egyes specifikus proteinekre (azaz minden egyes „detektált N-terminálisra”) meghatároztuk az összmennyiségre vonatkoztatott mol%-ot. Jelenlegi kísérletünkben csak a helyes E2-H6 N-terminálist detektáltuk, és hiányoztak azok az E2-H6-változatok, amelyek nem tartalmazták az E2 valamely aminosavát, illetve, amelyek E2-proteinekből hiányzó N-terminális aminosavakat tartalmaztak. Következtetésül, a *H. polymorpha* által CL-E2-H6-proteinként expresszált E2-H6-proteint minden további *in vitro* beavatkozás („processing”) nélkül, 95 %-nál nagyobb arányban pontosan hasított proteinként izoláltuk. Ez szöges ellentétben áll a *H. polymorpha* -  $\alpha$ MF-E2-H6-proteint E2-H6-proteinné átalakító – vezetőpeptid-eltávolításának hűségével, ami az izolált proteinek kb. 25 %-ánál következik be (ld. 3. táblázat).

#### 18. példa

*Hansenula polymorpha*-ban CL-H6-K-E1-et kódoló konstrukcióval expresszálatott HCV-E1-protein tisztítása és biokémiai karakterizálása, valamint a H6-tartalmú proteinek *in vitro* hasítása

A CL-vezetőpeptid *Hansenula polymorpha*-ban expresszálatott CL-H6-K-E1-proteinről történő lehasítása hatékonyságát, valamint a H6 (His-toldalék)-adapterpeptid és az Endo-Lys érési („processing”) hely eltávolítására végzett *in vitro* hasítás hatékonyságát vizsgáltuk. Mivel a HCV-E1s-t (192-326. aminosavak) N-terminális His-K-toldalékot tartalmazó CL-H6-K-E1-proteinként expresszáltattuk, e protein a 17. példában leírt módszerrel gyorsan és hatékonyan tisztítható. A H6-K-E1 (és az esetleges maradék CL-H6-K-E1) proteinek IMAC-kromatográfiás tisztításának elúciós görbéjét a 42. ábrán mutatjuk be. Az SDS-PAGE-

gélelektroforézissel kapott gél ezüstszínezéssel végzett festését, illetve – E1 elleni specifikus monoklonális antitest (IGH201) alkalmazásával végzett - western-blot analízist (43. ábra) követően a rekombináns E1s-termékeket tartalmazó eluált frakciókat (63-69. frakciók) összeöntöttük („IMAC-összeöntés”), és ezt a H6-K fúziós farok eltávolítása céljából, egy éjszakán át

5 Lys-C endoproteinázzal (Roche) kezeltük (enzim/szubsztrát tömegarány: 1:50; 37 °C). A nem hasított fúziós terméket Ni-IDA-oszlopon végzett negatív IMAC-kromatográfiás lépéssel távolítottuk el, és az Endo-Lys-C-vel hasított proteineket az átfolyó frakcióban gyűjtöttük össze. Ennek során a Lys-C endoproteinázzal emésztett proteinmintát – 1 %(V/V) Empigen-B-t tartalmazó 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O pufferrel (pH=7,2; „B” puffer) végzett tízszeres hígítást követően - Ni-IDA-oszlopra töltöttük, majd „B” pufferrel addig mostuk, míg a 280 nm hullám-

10 hosszánál mért abszorbancia el nem érte az alapszintet. Az átfolyót különböző frakciókban (1-40.) gyűjtöttük össze, majd ezeket E1s-termékek jelenlétére szkríneltük (44. ábra). Az intakt E1-proteint (amelyből az N-terminális H6-K-toldalék és az esetlegesen jelenlévő maradék CL-H6-K-toldalék eltávolításra került, és amelynek molekulatömege - SDS-PAGE-gél ezüstsínezéssel vagy E1 elleni specifikus monoklonális antitest (IGH201) alkalmazásával végzett western-blot analízissel meghatározva - kb. 15-30 kD) tartalmazó 7-28. frakciókat összeöntöttük,

15 s végül alkilezési reakciónak vetettük alá (37 °C-on 30 perces inkubálás 5 mM DTT-vel, majd 37 °C-on 30 perces inkubálás 20 mM jód-acetammiddal).

Ezt az anyagot Edman-lebontással N-terminális szekvenálásnak vetettük alá. Ennek

20 során a proteinmintákat 3 % Empigen-BB-t tartalmazó foszfátpufferelt sóoldatban, N-glikozidázal (Roche; 0,2 egység/μg E1) 37 °C-on egy óra hosszat inkubáltuk vagy kezelés nélkül hagytuk. A glikozilált és deglikozilált E1-proteineket SDS-PAGE-gélelektroforézisnek vetettük alá, és aminosav-szekvenálás céljából PVDF-membránra másoltuk. Az analízist PROCISE™ 492 proteinszekvenáló készülék (Applied Biosystems) alkalmazásával végeztük.

25 Az N-terminális szekvenálás alapján meghatározható a pontosan hasított E1-termék (amelyről a H6-K-szekvencia megfelelően lett lehasítva) mennyisége. A proteintermékek összmennyiségét az Edman-lebontással kapott csúcsok intenzitása alapján, pmol protein egységekben számítottuk ki, majd az egyes specifikus proteinekre (azaz minden egyes „detektált N-terminálisra”) meghatároztuk az összmennyiségre vonatkoztatott mol%-ot. Jelenlegi kísérletünkben csak

30 a helyes E1 N-terminálist detektáltuk, a H6-K-E1 egyéb „processing” változatainak N-terminálisait nem. Mindezek alapján, a H6-K-E1 (és esetenként a maradék CL-H6-K-E1) protein – Endo Lys-C által - E1-proteinné történő *in vitro* érése 95 %-nál nagyobb hűséggel következett

be.

#### 19. példa

##### A HCV-E1 kisebb mértékben glikozilált alakjainak specifikus eltávolítása heparinnal

A HCV-burokproteinek élesztősejtekből történő specifikus tisztítási lépései azonosítása céljából a heparinos kötődést vizsgáltuk. Ismeretes, hogy a heparin számos vírushoz képes kötődni, így a HCV-burokhoz történő kötődését évekkal ezelőtt már felvetették [Garson és mtsai. (1999)]. E potenciális kötődés tanulmányozása céljából a heparint biotiniláltuk, és HCV-E1-proteinnel bekövetkező interakcióját - *H. polymorpha*-ból származó, szulfonált HCV-E1-proteinnel, *H. polymorpha*-ból származó, alkilezett HCV-E1-proteinnel (mindkettőt a 16. példában leírtak szerint hoztuk létre), illetve vaccinia expressziós vektorral transzfektált emlőseredetű sejtek tenyészetéből származó, alkilezett HCV-E1-proteinnel bevont – mikrotiter-tálcákon vizsgáltuk. Erős kötődést, meglepő módon, csak a *H. polymorpha*-ból származó, szulfonált HCV-E1 esetében figyeltünk meg, míg az emlőseredetű sejtek tenyészetéből származó HCV-E1-proteinhez történő kötődés teljesen hiányzott. Western-blot analízissel kimutattuk, hogy ez a kötődés a HCV-E1-proteinelegy kisebb molekulatömegű csíkjaira specifikus (ld. 45. ábra), melyek a kisebb mértékben glikozilált, érett HCV-E1s-nek felelnek meg. A 45. ábrán látható az is, hogy a szulfonálás a heparin kötődése szempontjából nem kulcsfontosságú, mivel a szulfonáltság megszüntetése után továbbra is detektáltunk kis molekulatömegű E1-proteinhez történő kötődést (4. sáv). Ezzel szemben, az alkilezés jelentős mértékben csökkenti a heparin kötődését, azonban ezt az e példában alkalmazott specifikus alkilezőszer (jódacetamid) okozhatta. E felismerés további bizonyítékát szolgáltatatta a CL-HCV-burokprotein élesztőkkel kompatibilis expressziós kazettájának ipari alkalmazhatóságát, mivel a HCV-E1-készítményeket specifikusan olyan HCV-E1-protein készítményekké dúsíthatjuk, amelyekre magas fokú glikoziláltság jellemző (azaz több glikozilációs hely van elfoglalva).

#### 20. példa

##### Vírusszerű részecskék (VLP-k) létrehozása és vizsgálata

A *H. polymorpha*-ban termeltetett HCV-E1- és HCV-E2-proteinek (ld. a 16-18. példákat) vírusszerű részecskékké történő átalakítását lényegében Depla és mtsai. (WO 99/67285) és Bosman és mtsai. (WO 01/30815) leírása szerint hajtottuk végre. Röviden összefoglalva: a transzformált *H. polymorpha* sejtek – HCV-burokproteinek termelődését eredményező – tenyésztése után a sejteket betakarítottuk, GuHCl alkalmazásával feltártuk és szulfonáltuk (ld. a 17. példát). Ezt követően a His-toldalékot hordozó proteineket IMAC-kromatográfiával tisztítottuk és ultraszűrőssel betöményítettük (17. példa).

Vírusszerű részecskék létrehozása szulfonált Cys-tiolcsoportokat tartalmazó HCV-burokproteinekből

Az izolálási eljárás során szulfonált, betöményített HCV-burokproteineket nem redukáltuk, és - előzetesen 1 %(V/V) Empigent tartalmazó foszfátpufferelt sóoldattal ekvibrált -  
 5 méretszelekciós kromatográfiás oszlopra (Superdex G200; Pharmacia) vittük fel. Az eluált frakciókat SDS-PAGE és western-blot analízissel vizsgáltuk. A kb. 29 kD és kb. 15 kD közötti relatív molekulatömegű (SDS-PAGE-gélen megfigyelt migráció alapján) frakciókat összeöntöttük, betöményítettük és – a vírusszerű részecskék (VLP) kialakulásának előidézése céljából - Superdex G200-oszlopra töltöttük, mely oszlopot előzetesen 3 % (m/V) betaint tartalmazó  
 10 foszfátpufferelt sóoldattal ekvibráltunk. A frakciókat összeöntöttük, betöményítettük és 0,5 % (m/V) betaint tartalmazó foszfátpufferelt sóoldat alkalmazásával sótalanítottuk.

Vírusszerű részecskék létrehozása irreverzibilisen módosított Cys-tiolcsoportokat tartalmazó HCV-burokproteinekből

Az izolálási eljárás során szulfonált, betöményített HCV-burokproteineket a szulfonált  
 15 Cys-tiolcsoportok szabad Cys-tiolcsoportokká történő átalakítása céljából, foszfátpufferelt sóoldatban 5 mM DTT jelenlétében végzett inkubálással redukáltuk. Az irreverzibilis Cys-tiolcsoport-módosítást a következők szerint hajtottuk végre: (i) 30 perces inkubálás 20 mM jód-acetamid jelenlétében; vagy (ii) 30 perces inkubálás 5 mM N-etilmaleimid (NEM) és 15 mM biotin-N-etilmaleimid jelenlétében. Ezután a proteineket méretszelekciós kromatográfiás  
 20 oszlopra (Superdex G200; Pharmacia) vittük fel. Az oszlopot előzetesen 1 %(V/V) Empigent tartalmazó foszfátpufferelt sóoldatban (a jód-acetamidok blokkolásánál), vagy 0,2 % CHAPS-t tartalmazó foszfátpufferelt sóoldatban (a NEM és biotin-NEM alkalmazásával végzett blokkolásánál) ekvibráltuk. Az eluált frakciókat SDS-PAGE és western-blot analízissel vizsgáltuk. A kb. 29 kD és kb. 15 kD közötti relatív molekulatömegű (SDS-PAGE-gélen megfigyelt migráció alapján) frakciókat összeöntöttük, betöményítettük és – a vírusszerű részecskék (VLP) ki-  
 25 alakulásának előidézése céljából - Superdex G200-oszlopra töltöttük, mely oszlopot előzetesen 3 % (m/V) betaint tartalmazó foszfátpufferelt sóoldattal ekvibráltunk. A frakciókat összeöntöttük, betöményítettük és 0,5 % (m/V) betaint tartalmazó foszfátpufferelt sóoldat (a jód-acetamidok blokkolás esetén), vagy 0,5 % (m/V) betaint tartalmazó foszfátpufferelt sóoldat (az  
 30 N-etilmaleimiddal és biotin-N-etilmaleimiddal végzett blokkolás esetén) alkalmazásával sótalanítottuk.

### Vírusszerű részecskék létrehozása reverzibilisen módosított Cys-tiolcsoportokat tartalmazó HCV-burokproteinekből

Az izolálási eljárás során szulfonált, betöményített HCV-burokproteineket a szulfonált Cys-tiolcsoportok szabad Cys-tiolcsoportokká történő átalakítása céljából, foszfátpufferelt sóoldatban 5 mM DTT jelenlétében végzett inkubálással redukáltuk. A Cys-tiolcsoportok reverzibilis módosítását ditio-dipiridin (DTDP), ditiokarbamát (DTC) vagy cisztein jelenlétében végzett 30 perces inkubálással hajtottuk végre. Ezt követően a proteineket - előzetesen 1 % (V/V) Empigent tartalmazó foszfátpufferelt sóoldattal ekvibrált - méretszelektációs kromatográfiás oszlopra (Superdex G200; Pharmacia) vittük fel. Az eluált frakciókat SDS-PAGE és western-blot analízissel vizsgáltuk. A kb. 29 kD és kb. 15 kD közötti relatív molekulatömegű (SDS-PAGE-gélen megfigyelt migráció alapján) frakciókat összeöntöttük, betöményítettük és – a vírusszerű részecskék (VLP) kialakulásának előidézése céljából - Superdex G200-oszlopra töltöttük, mely oszlopot előzetesen 3 % (m/V) betaint tartalmazó foszfátpufferelt sóoldattal ekvibráltunk. A frakciókat összeöntöttük, betöményítettük és 0,5 % (m/V) betaint tartalmazó foszfátpufferelt sóoldat alkalmazásával sótalanítottuk.

A vírusszerű részecskék *H. polymorpha* által expresszált E2-H6-proteinből történő előállítás céljából - 3 % (m/V) betaint tartalmazó foszfátpufferelt sóoldat alkalmazásával - végzett méretszelektációs kromatográfia elúciós görbét a 46. ábrán (szulfonált proteinekre), illetve a 47. ábrán (jód-acetamiddal alkilezett proteinekre) mutatjuk be.

A vírusszerű részecskék *H. polymorpha* által expresszált E1-proteinből történő előállítás céljából - 3 % (m/V) betaint tartalmazó foszfátpufferelt sóoldat alkalmazásával - végzett méretszelektációs kromatográfia elúciós görbét a 48. ábrán (szulfonált proteinekre), illetve a 49. ábrán (jód-acetamiddal alkilezett proteinekre) mutatjuk be. A létrehozott vírusszerű részecskéket SDS-PAGE és western-blot analízissel vizsgáltuk (ld. az 50. ábrát).

### A *H. polymorpha* által expresszált HCV-burokproteinekből kialakított vírusszerű részecskék méretének meghatározása

A vírusszerű részecskék méretét dinamikus fényszórási technika alkalmazásával határoztuk meg. A fényszórási kísérleteket - foton-korrelációs spektroszkópiai (PCS) szoftverrel kontrollált - részecskeméret-analizátor (Model Zetasizer 1000 HS, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcester, Egyesült Királyság) alkalmazásával végeztük. A foton-korrelációs spektroszkópia vagy dinamikus fényszóródási (DLS) technika egy optikai módszer, amely a Brown-féle mozgást méri, és azt a részecskék méretéhez arányítja. A módszer lényege, hogy szuszpenzióban lévő – és Brown-féle mozgást mutató - makromolekulák vagy részecskék sokaságán

keresztül folytonos, látható lézersugarat irányítunk. A lézerfény bizonyos hányada a részecské-  
ken szóródik, és ezt a szórt fényt fénysokszorozóval mérjük. A szórt fény intenzitásának inga-  
dozásait elektromos impulzusokká alakítjuk, melyeket korrelátorba táplálunk, amely auto-  
korrelációs függvényt generál, amelyet számítógépbe táplálva elvégezzük a megfelelő adatfel-  
dolgozást. Lézerként 10 mW-os monokromatikus koherens He-Ne lézert (állandó, 633 nm-es  
hullámhosszúsággal) alkalmaztunk. Mindegyik mintával három-hat egymás utáni mérést vége-  
zünk.

A kísérletek eredményeit az 5. táblázatban foglaljuk össze.

#### 5. táblázat

10 A megadott, *H. polymorpha* által expresszált HCV-burokproteinek VLP-készítményeinek di-  
namikus fényszóródási analízisének eredményei

| Cys-tiol módosítás             | E1-H6    | E2-VIEGR-H6 | E1       |
|--------------------------------|----------|-------------|----------|
| Szulfonálás                    | 25-45 nm | 20 nm       | 20-26 nm |
| Alkilezés jó-d-<br>acetamiddal | 23-56 nm | 20-56 nm    | 21-25 nm |

A víruszerű részecskék méretét átlagos átmérőként adtuk meg.

Azt a váratlan megfigyelést tettük, hogy a *H. polymorpha*-ból származó, szulfonált  
15 HCV-E1-protein *Hansenula*-ból származó, alkilezett HCV-E1-proteinnel azonos mérettarto-  
mányba eső részecskéket alkot. Ez azért meglepő, mert a negatív töltések – szulfonálás (a  
HCV-E1-proteinben akár nyolc Cys-tiolcsoport módosítható) eredményeként bekövetkező -  
nagy mértékű nettó növekedésének az alegységek között ionos taszítást kellene indukálnia. A  
ciszteinek reverzibilis módosítását eredményező többi tesztelt reagens szintén lehetővé tette a  
20 részecskeképződést, azonban az így előállított HCV-E1 (a HCV-E1 diszulfid-alapú aggregá-  
ciójával) kevésbé bizonyult stabilnak, mint a szulfonált anyag. Ezen egyéb reverzibilis blokkó-  
lók alkalmazása céljából a feltételek további optimalizálására van szükség.

#### 21. példa

25 *Hansenula* sejtek által termelt HCV-E1-H6-protein és vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű  
sejtek által termelt HCV-E1-protein egyenértékűsége antigénhatás szempontjából

A *Hansenula* sejtek által termelt HCV-E1-H6-protein krónikus HCV-hordozók szé-  
rumával mutatott reaktivitását HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sej-  
tek által termelt HCV-E1-protein reaktivitásával hasonlítottuk össze (Depla és mtsai., a WO  
99/67285 számú nemzetközi közzétételi iratban). Mindkét tesztelt HCV-E1-készítmény olyan

vírusszerű részecskékből (VLP) állt, melyekben a HCV-E1-proteinek N-etilmaleimiddel (NEM) és biotin-N-etilmaleimiddel (biotin-NEM) voltak alkilezve. Mindkét HCV-E1-VLP-készítmény krónikus HCV-hordozók szérumával mutatott reaktivitását ELISA-teszttel határoztuk meg. Ennek során biotinilált E1-proteint sztreptavidinnel bevont ELISA-tálcákhoz kötöttünk, majd a tálcákhoz 1/20 hígításban humán szérumot adtunk. A szérum E1-proteinhez kötődött immunglobulinjait – peroxidázzal jelölt – nyúl eredetű anti-humán IgG-Fc specifikus második antitesttel detektáltuk. Az eredményeket OD-értékeként fejeztük ki. A kapott eredményeket a 6. táblázatban foglaljuk össze. Az átlagértékek az összes tesztelt szérumminta OD-értékének átlagát reprezentálják.

10

6. táblázat

Emlőseredetű sejtek tenyészetében vagy *H. polymorpha* sejtekben termelődött E1-protein antigenitásának krónikus HCV-hordozó személyekből származó szérumokon végzett tesztelésének eredménye

| Szérum | <i>Hansecula</i> | Emlőseredetű | Szérum | <i>Hansecula</i> | Emlőseredetű |
|--------|------------------|--------------|--------|------------------|--------------|
| 17766  | 1,218            | 1,159        | 55337  | 1,591            | 1,416        |
| 17767  | 1.513            | 1.363        | 55348  | 1.392            | 1.261        |
| 17777  | 0,806            | 0,626        | 55340  | 1,202            | 0,959        |
| 17784  | 1,592            | 1,527        | 55342  | 1,599            | 1,477        |
| 17785  | 1,508            | 1,439        | 55345  | 1,266            | 1,428        |
| 17794  | 1,724            | 1,597        | 55349  | 1329             | 1,137        |
| 17798  | 1.132            | 0.989        | 55350  | 1.486            | 1.422        |
| 17801  | 1,636            | 1,504        | 55352  | 0,722            | 1,329        |
| 17805  | 1,053            | 0,944        | 55353  | 1,065            | 1,157        |
| 17810  | 1,134            | 0,999        | 55354  | 11,118           | 1,092        |
| 17819  | 1,404            | 1,24         | 55355  | 0,754            | 0,677        |
| 17820  | 1,308            | 1,4          | 55362  | 1,43             | 1,349        |
| 17826  | 1.163            | 1.009        | 55365  | 1.612            | 1.608        |
| 17827  | 1,668            | 1,652        | 55368  | 0,972            | 0,959        |
| 17849  | 1.595            | 1.317        | 55369  | 1.506            | 1.377        |
| 55333  | 1.217            | 1.168,       | Átlag  | 1,313            | 1,245        |

Ahogy e táblázatból látható, a HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sejtekben termelt HCV-E1 és a *H. polymorpha* által termelt HCV-E1 reaktivitásában nem találtunk különbséget.

## 22. példa

### 5 Hansemula sejtek által termelt HCV-E1-H6-protein és vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sejtek által termelt HCV-E1-protein egyenértékűsége immunogenitás szempontjából

A *Hansemula* sejtek által termelt HCV-E1-H6-protein immunogenitását HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sejtek által termelt HCV-E1-protein immunogenitásával hasonlítottuk össze (ld. Depla és mtsai., a WO 99/67285 számú nemzetközi közzétételi iratban). Mindkét tesztelt HCV-E1-készítmény olyan vírusszerű részecskékből (VLP) állt, melyekben a HCV-E1-proteinek jó-d-acetamiddal voltak alkilezve. Mindkét VLP-készítményt alumínium-hidroxid („alum”) adjuvánssal kombinálva Balb/c-egerekbe injektáltuk. Az immunizálást három intramuszkuláris/szubkután injekcióval (az egyes injektált dózisok 0,13 % Alhydrogel-t (Superfos, Dánia) tartalmazó 125 µL oldatban 5 µg E1-proteint tartalmaztak), az injektálások között három hetes időnközökkel hajtottuk végre. Az egereket a harmadik immunizálás után tíz nappal kivéztettük.

E kísérlet eredményeit az 51. ábrán mutatjuk be. Az 51. ábra felső részén az emlőseredetű sejtekben termelt E1-proteinből kialakított vírusszerű részecskékkal végzett immunizálást követően kapott antitestek titerét szemléltetjük. Az antitest-titerek ELISA-tesztel határoztuk meg (ld. 21. példa), melynek során ELISA-tálcákat az emlőseredetű sejtek által termelt E1-proteinnal („M”) vagy *Hansemula* sejtek által termelt E1-proteinnal („H”) vontunk be, majd a tálcákat kazeinnel blokkoltuk. Az ábra alsó részén a *Hansemula* sejtekben termelt E1-proteinből kialakított vírusszerű részecskékkal végzett immunizálást követően kapott antitestek titerét szemléltetjük. Az antitest-titerek ELISA-tesztel határoztuk meg (ld. 21. példa), melynek során ELISA-tálcákat az emlőseredetű sejtek által termelt E1-proteinnal („M”) vagy *Hansemula* sejtek által termelt E1-proteinnal („H”) vontunk be, majd a tálcákat kazeinnel blokkoltuk.

A meghatározott antitest-titerek végpont-titerek. A végpont-titerek a teszt háttérték-átlagának kétszeresével egyenlő (ELISA-tesztel meghatározott) OD-értéket eredményező szérumkoncentrációnak felelnek meg.

Az 51. ábrán látható, hogy a kétféle E1-készítmény immunogén tulajdonságai között nem találtunk jelentős különbségeket, és a meghatározott antitest-titerek függetlenek az ELISA-tesztben végpont-titer megállapítására alkalmazott antigéntől.

Az élesztőeredetű HCV-E1, vakcinálást követően, hasonló védő reakciót indukált, mint az emlőseredetű sejtenyészetből származó, alkilezett HCV-E1. Az utóbbi által indukált reakció képes volt a HCV – akut fertőzés utáni – krónikus elterjedésének megakadályozására.

### 23. példa

#### 5 Hansenula sejtekben termelt, szulfonált HCV-E1-H6-protein antigénhatási és immunogenitási profilja

A *Hansenula* sejtek által termelt HCV-E1-H6-protein krónikus HCV-hordozók szérumával mutatott reaktivitását HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sejtek által termelt HCV-E1-protein reaktivitásával hasonlítottuk össze (Depla és mtsai., a WO 10 99/67285 számú nemzetközi közzétételi iratban). Mindkét tesztelt HCV-E1-készítmény olyan vírusszerű részecskékből (VLP) állt, melyekben a *Hansenula* sejtek által termelt HCV-E1-proteinek szulfonáltak, míg az emlőseredetű sejtek által termelt HCV-E1 alkilezett volt. Az eredményeket a 7. táblázatban mutatjuk be. Bár az átlagos reaktivitás hasonló volt, az egyes szérumoknál néhány jelentős különbséget tapasztaltunk. Ez arra utal, hogy a szulfonált anyag, 15 legalább néhány epitópját, más módon prezentálja, mint az alkilezett HCV-E1.

A *Hansenula* sejtek által termelt, szulfonált HCV-E1-H6-protein immunogenitását *Hansenula* sejtek által termelt, alkilezett HCV-E1-H6-protein immunogenitásával hasonlítottuk össze. Mindkét tesztelt HCV-E1-készítmény vírusszerű részecskékből állt. Mindkét VLP-készítményt alumínium-hidroxid („alum”) adjuvánssal kombinálva Balb/c-egerekbe injektáltuk. 20 Az immunizálást három intramuszkuláris/szubkután injekcióval (az egyes injektált dózisok 0,13 % Alhydrogel-t (Superfos, Dánia) tartalmazó 125 µL oldatban 5 µg E1-proteint tartalmaztak), az injektálások között három hetes időnközökkel hajtottuk végre. Az egereket a harmadik immunizálás után tíz nappal kivéztettük.

Az antitest-titerek a 22. példában leírtakhoz hasonlóan határoztuk meg. Meglepő 25 módon, a szulfonált anyaggal végzett immunizálás nagyobb antitest-titerek eredményezett, függetlenül attól, hogy a titer meghatározására alkalmazott ELISA-tesztben milyen antigént használtunk fel (51. ábra, fent : alkilezett E1 elleni antitestek titrálási eredményei; lent: szulfonált E1 elleni antitestek titrálási eredményei; az ábrán „A” jelentése: alkilezett E1-proteinnel bevont ELISA-tálca; „S” jelentése: szulfonált E1-proteinnel bevont ELISA-tálca). 30 Mindazonáltal, e kísérletben az egyes titerek – a teszt során alkalmazott antigéntől függően – különbözőek, ami igazolja a HCV-páciensekből származó szérumokkal tett megfigyeléseinket. Ennek megfelelően, a reverzibilisen módosított cisztein tiolcsoportokat tartalmazó HCV-E1 nagyobb immunogenitású lehet, és így HCV krónikus fertőzése elleni védeettséget biztosító

vakcinaként hatásosabban alkalmazható. Ezen túlmenően, kisebb valószínűséggel következik be az irreverzibilis blokkolás által indukált neo-epitópokra adott reakció indukálása.

7. táblázat

Emlőseredetű sejtenyészetben termeltetett, alkilezett E1-protein és a *H. polymorpha* sejtekben termeltetett, szulfonált E1-H6-protein antigenitásának krónikus HCV-hordozó személyekből („páciens szérumok”) származó szérumokkal és kontroll szérumokkal („vérdonor szérumok”) végzett vizsgálata

(A vizsgálat céljára az E1-proteinnel ELISA-tálcákat vontunk be, majd a tálcákat kazeinnel tovább telítettük. A tálcákhoz 1/20 hígításban humán szérumotadtunk, és a megkötődött immunoglobulinokat nyúl eredetű anti-humán IgG-Fc specifikus (peroxidázzal jelölt) második antitesttel detektáltuk. Az eredményeket OD-értékeként fejezzük ki. Az átlagértékek az összes tesztelt szérumminta OD-értékeinek átlagát reprezentálják.)

| Páciens szérumok |                  |              |
|------------------|------------------|--------------|
| Szérumminta      | <i>Hansenula</i> | Emlőseredetű |
| 17766            | 0,646            | 0,333        |
| 17777            | 0,46             | 0,447        |
| 17785            | 0,74             | 0,417        |
| 17794            | 1,446            | 1,487        |
| 17801            | 0,71             | 0,902        |
| 17819            | 0,312            | 0,539        |
| 17827            | 1,596            | 1,576        |
| 17849            | 0,586            | 0,964        |
| 55333            | 0,69             | 0,534        |
| 55338            | 0,461            | 0,233        |
| 55340            | 0,106            | 0,084        |
| 55345            | 1,474            | 1,258        |
| 55352            | 1,008            | 0,668        |
| 55355            | 0,453            | 0,444        |
| 55362            | 0,362            | 0,717        |
| 55369            | 0,24             | 0,452        |
| <u>Átlag:</u>    | <u>0,706</u>     | <u>0,691</u> |

| Vérdonor szérum |                  |              |
|-----------------|------------------|--------------|
| Szérumminta     | <i>Hansenula</i> | Emlőseredetű |
| F500            | 0,055            | 0,054        |
| F504            | 0,05             | 0,05         |
| F508            | 0,05             | 0,054        |
| F510            | 0,05             | 0,058        |
| F511            | 0,05             | 0,051        |
| F512            | 0,051            | 0,057        |
| F513            | 0,051            | 0,052        |
| F527            | 0,057            | 0,054        |
| <u>Átlag:</u>   | <u>0,052</u>     | <u>0,054</u> |

## 24. példa

A *Hansenula* sejtekben termeltetett HCV-E1-H6-protein és a vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sejtekben termeltetett HCV-E1-protein azonos antigén reaktivitása vakcinált csimpánzokból származó szérumokkal

A HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sejtek által termelt E1-protein és a *Hansenula* sejtek által termelt E1-H6-protein (mindkettő alkilezett) vakcinált csimpánzokból származó szérummal és monoklonális antitestekkel mutatott reaktivitását hasonlítottuk össze. Ennek során ELISA-tálcákat közvetlenül az említett E1-proteinekkal vontunk be, majd a tálcákat kazeinnel telítettük. Az ELISA-tálcákhoz kötött E1-proteineket megkötő antitestek végpont-titerét csimpánzokból származó szérumokra, illetve specifikus egéreredetű monoklonális antitestekre (melyek mindegyikét emlőseredetű sejtek által termelt E1-proteinnel immunizált állatokból nyertük) határoztuk meg. A végpont-titer meghatározását a 22. példában leírtak szerint végeztük. Egéreredetű monoklonális antitestekként a következőket alkalmaztuk: IGH201 (ld. a 15. példát); IGH198 (Maertens és mtsai. WO 96/04385 számú nemzetközi közzétételi iratában IGH198 = 23C12); IGH203 (Maertens és mtsai. WO 96/04385 számú nemzetközi közzétételi iratában IGH203 = 15G6); IGH202 (Maertens és mtsai. WO 96/50301 számú nemzetközi közzétételi iratában IGH202 = 3F3).

Ahogy az 53. ábrán látható, a *Hansenula* sejtek, illetve emlőseredetű sejtek által termelt E1-proteinnel tesztelve hét különböző csimpánz reaktivitása azonos volt. A HCV-E1 elleni monoklonális antitestek reaktivitása szintén csaknem teljesen azonosnak bizonyult. A csim-

pánzok közül kettőt (Yorant és Martit) profilaktikus vakcina vizsgálatba is bevontunk – ezekben az állatokban az akut fertőzés (immunpróbát követően) megszűnt, míg egy kontroll állat a fertőzés leküzdésére nem volt képes. A többi öt csimpánzzal (Ton, Phil, Marcel, Peggy és Femma) terápiás vakcinálási vizsgálatot végeztünk; ezekben - HCV-E1-proteinnel végzett immunizálást követően - a májkárosodás mértékének csökkenését detektáltuk, amit a szérumban meghatározott ALT alapján és/vagy májbiopszián meghatározott szövettani aktivitási index alapján mértünk.

Az e kísérletben kapott eredmények egyértelműen eltérnek Mustilli és mtsai. eredményeitől (Mustilli és mtsai. (1999), akik HCV-E2-proteint *Saccharomyces cerevisiae*-ben és *Kluyveromyces lactis*-ban termeltették. Mindazonáltal, az élesztőben termeltetett, tisztított E2-protein annyiban különbözik az emlőseredetű (CHO) sejtek által termelt HCV-E2-proteintől, hogy az emlőseredetű sejtek által termelt HCV-E2-proteinnel immunizált csimpánzokból származó szérumok esetében kisebb reaktivitás figyelhető meg, míg a monoklonális antitestekre vonatkozó reaktivitás az élesztősejtekben termelt HCV-E2-proteinnel volt nagyobb.

## 25. példa

### HCV-E1-protein glikozilációs profiljának megállapítása fluorofórral segített szénhidrát-elektroforézissel (FACE)

A *Hansenula* sejtek által termelt HCV-E1-protein és a HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sejtek által termelt HCV-E1-protein glikozilációs profiljait Depla és mtsai. leírása szerint (ld. a WO 99/67285 számú nemzetközi közzétételi iratot), fluorofórral segített szénhidrát-elektroforézissel (FACE) alkalmazásával hasonlítottuk össze. Ennek során az emlőseredetű, illetve *Hansenula* sejtek által termelt E1-proteinekről peptid-N-glikozidázzal (PNGáz-F) eltávolítottuk az oligoszacharidokat, melyeket ANTS-sel jelöltünk (a PNGáz-F-fel végzett emésztést megelőzően az E1-proteineket jódiacetamiddal alkileztük). Az ANTS-sel jelölt oligoszacharidokat 21 %-os poliakrilamid-gélen 4 °C-on, 15 mA áramerősséggel, 2-3 óra hosszat végzett gélelektroforézissel elválasztottuk. Az 54. ábrán látható eredményekből arra következtethetünk, hogy az emlőseredetű sejtekben termelt E1-protein és a *Hansenula* sejtekben termelt E1-H6-protein oligoszacharidjai 7-11 monoszacharidos polimerizációs fokú oligomaltózhoz hasonló migrációt mutattak. Ez azt jelzi, hogy a *Hansenula* expressziós rendszer, meglepő módon, olyan E1-proteint eredményez, amely nem hiperglikozilált, és amelynek cukorlánc a hasonló az emlőseredetű sejtekben termelődött E1-proteinekhez kapcsolt cukorláncokhoz.

26. példa

Saccharomyces és Hansenula sejtekben termelt Els-proteinből, illetve HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sejtekben termelt Els-proteinből származó, N-kötött oligoszacharidok szekvenálása

- 5 *Saccharomyces* vagy *Hansenula* tenyészetből tisztított (ld. a 15. és 16. példát), illetve HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött RK13-sejtek tenyészetéből tisztított (ld. a WO 96/04385 számú nemzetközi közzétételi iratot) Els-protein (225 µg) 0,5 % betaint tartalmazó foszfátpufferelt sóoldatban készített oldatát deglikozilációs inkubáló pufferrel (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,75 % Nonidet P-40) 140 µg/mL koncentrációra hígítottuk. Az oldat pH-ját tö-
- 10 mény foszforsavval 5,5-re állítottuk be, majd az oldathoz két egység PNGáz-F-et (*Flavobacterium meningosepticum*-ból származó peptid-N<sup>4</sup>-(acetyl-β-glükózaminol)-aszparagin amidáz; EC 3.5.1.52; Roche) adtunk, és a mintát 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Ezt követően az oldat pH-ját tömény foszforsavval 5,5-re állítottuk be, majd a proteineket és az oligoszacharidokat négyszeres térfogatú acetone hozzáadásával -20 °C-on precipitáltuk, és az
- 15 elegyeket -20 °C-on 15 percig inkubáltuk. A mintákat 4 °C-on 13000-es percnkénti fordulatszámmal 5 percig centrifugáltuk. Az acetonos felülúszót leöntöttük, az üledékhez 150 µL jéghideg 60 %-os metanolt adtunk és -20 °C-on egy óra hosszat inkubáltuk. A felszabadított oligoszacharidokat tartalmazó metanolos felülúszót összegyűjtöttük, és bepárlócentrifugában (SpeedVac) megszáritottuk.
- 20 A megszáritott Els-glükánokat, valamint a referencia oligoszacharidokat (Glyko, Bicester, Egyesült Királyság) 5 µL 2-aminobenzamid (2-AB) jelölőreagensben (30 % HOAc/70 % DMSO elegyében ±0,35 M 2-AB + ±1M NaCNBH<sub>3</sub>) oldottuk, miáltal a 5 µM és 100 µM közötti glükán-végkoncentrációjú oldatokat kaptunk. A referencia oligonukleotidok a következők voltak (ld. 55. ábra): Man-9 (11 monoszacharid-egység), Man-8 (10 monoszacharid-egység), Man-7 (9 monoszacharid-egység), man-6 (8 monoszacharid-egység) és Man-5 (7 monoszacharid-egység). A glükánoldatot 65 °C-on két óra hosszat inkubáltuk. 30 perc elteltével a mintát vortexezéssel összekevertük, majd konjugálást követően a felesleges 2-AB-t eltávolítottuk. Ennek során a mintát 16 µL tisztított vízzel (MilliQ) hígítottuk és VacElutrendszerhez (Varian) kapcsolt, 1 cm átmérőjű és 1,2 cm magasságú Sephadex G-10 oszlopra
- 25 (Amersham Biosciences) töltöttük, miután az oszlopot leszárítottuk.
- 30

A jelölt oligoszacharidokat 2 x 100 µL tisztított vízzel (MilliQ) eluáltuk. A referencia szénhidrátok (Man-9, Man-8, Man-7 és Man-6) eluátumait megszáritottuk és a HPLC-analízis

elvégzéséig  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az Els-minták eluátumait, valamint a Man-9 referencia glükánt négy, számozott PCR-csőbe osztottuk szét és megszárítottuk. A 8. táblázatban vázolt reakciókat  $37^{\circ}\text{C}$ -on egy éjszakán át folytattuk, kivéve a 3. kémcsőben végzett reakciót, melyet egy óra elteltével befejeztünk. Az exoglikozidáz enzimeket (Glyko, Bicester, Egyesült Királyság) a következő végkoncentrációkban alkalmaztuk:  $\alpha$ 1-2 mannozidáz (*Aspergillus saitoi*): 2 mE/mL;  $\alpha$ -mannozidáz (kenyérfa): 50 E/mL;  $\beta$ -mannozidáz (*Helix pomatia*) 4 E/mL.

8. táblázat

Az oligoszacharidok szekvenálására alkalmazott reakcióelegyek áttekintése

|                                               | 1. cső | 2. cső | 3. cső | 4. cső | 5. cső |
|-----------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Els (pmol)                                    | 400    | 400    | 400    | 400    | 400    |
| $\alpha$ 1-2 mannozidáz ( $\mu\text{L}$ )     | -      | 4      | -      | -      | -      |
| $\alpha$ -mannozidáz ( $\mu\text{L}$ )        | -      | -      | 5      | 5      | 5      |
| $\beta$ -mannozidáz ( $\mu\text{L}$ )         | -      | -      | -      | -      | 4      |
| Inkubáló puffer 4x ( $\mu\text{L}$ )          | 5      | 5      | 5      | 5      | 5      |
| MilliQ $\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ ) | 15     | 11     | 10     | 10     | 6      |

Az 56. ábrán egy magasabb polimerizációs fokú oligomannózt mutatunk be, amely kitobiózhoz kapcsolt 10 mannózyökből áll. Mindegyik láncvégi mannózyök  $\alpha$ 1-3 kötással kapcsolódik egy nem láncvégi mannózyökhöz. Az 56. ábrán bemutatott oligomannóz teljesen rezisztens az  $\alpha$ 1-2 mannozidáz exoglikozidáz hasításával szemben. Az 56. ábrán látható oligomannóz  $\alpha$ -mannozidázzal végzett, hosszú ideig tartó (egy éjszakás) inkubálása az összes  $\alpha$ -kötés ( $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3 és  $\alpha$ 1-6) hasítását eredményezte, a  $\beta$ -kötéseket azonban nem. Az így kapott oligoszacharid 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz, amely a  $\beta$ -mannozidáz exoglikozidázzal végzett kezeléssel mannózzá és kitobiózzá alakítható. Az  $\alpha$ -mannozidáz, a forgalmazó (Glyko) adatai szerint, a Man-6 referencia oligoszacharidot (ld. 55/D ábra) teljes egészében 4'- $\beta$ -mannozil-kitobiózzá alakítja, és a  $\beta$ -mannozidáz általi, mannózzá és kitobiózzá történő átalakítást szintén teljesnek tekinthető.

Az 57. ábrán olyan magasabb polimerizációs fokú oligomannóz látható, amely kitobiózhoz kapcsolt kilenc mannózyökből áll. Ebben az oligomannózból egy terminális mannózyök  $\alpha$ 1-2 kötással kapcsolódik a nem terminális mannózyökhöz. Az  $\alpha$ 1-2 mannozidáz exoglikozidáz hatására a  $\alpha$ 1-2 kötésű mannóz eltávolításra kerül, majd ezt követően,  $\alpha$ -

mannozidáz és  $\beta$ -mannozidáz aktivitása révén, az 56. ábrán bemutatott oligomannóznál leírt reakciótermékek képződnek. A forgalmazó (Glyko) adatai szerint az  $\alpha$ 1-2 mannozidáz a Man-9 és a Man-6 referencia oligoszacharidot 90 %-nál nagyobb hatékonysággal képesek Man-5 oligomannózzá átalakítani (ld. az 55. ábrát).

5 Az 58. ábrán a magasabb polimerizációs fokú Man-9 referencia oligomannózt mutatjuk be, amely kitobiózhoz kapcsolt kilenc mannózyökből áll. Ebben az oligomannózból valamilyen láncvégi mannózyök  $\alpha$ 1-2 kötéssel kapcsolódik a nem láncvégi mannózyökhöz. Ilyenformán, a forgalmazó adatai szerint, az  $\alpha$ 1-2 mannozidáz exoglikozidáz a Man-9 oligomannózt 90 %-nál nagyobb hatékonysággal képes Man-5 oligomannózzá átalakítani. Az  
10  $\alpha$ -mannozidázzal ezt követően végzett emésztéssel a Man-5 4'- $\beta$ -mannozil-kitobiózzá alakul át.

A 8. táblázatban megadott összetételű reakcióelegyeket vákuumos bepárlócentrifugában vagy liofilizálókészülékben szárítottuk és HPLC-analízis elvégzéséig  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az oszlopra történő feltöltés előtt mindegyik mintát (E1s és referencia) 25  $\mu\text{L}$  vízben oldottuk,  
15 majd – Waters Alliance HPLC-állomáshoz kapcsolt – TSK gel-Amide-80 oszlopra (0,46 x 25 cm; Tosoh Biosep) vittük fel.

Az oligoszacharidok elválasztását környezeti hőmérsékleten, 1 mL/perc átfolyási sebességgel végeztük. „A” oldószerként 0,1 % ecetsavat tartalmazó acetonitrilt, „B” oldószerként pedig 0,2 % ecetsavat és 0,2 % trietilamin tartalmazó vizet alkalmaztunk. A 2-AB-vel je-  
20 lölt oligoszacharidok elválasztását ötszörös oszloptérfogatnyi 28 % „B” oldószer-tartalmú izokratikus eleggyel végzett elúcióval kezdtük, melyet 15 oszloptérfogaton keresztül, lineáris emelkedéssel 45 % „B” oldószer-tartalomig növelve folytattunk.

A Man-6 referencia oligoszacharid  $53 \pm 1$  percnél, a Man-7  $59 \pm 1$  percnél, a Man-8  $67 \pm 2$  percnél, a Man-9  $70 \pm 1$  percnél, míg a 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz  $10 \pm 1$  percnél, a  
25 kitobióz pedig  $6 \pm 1$  percnél eluálódik (ábrát nem közlünk). Ezt a Man-9 reakciótermékeire a 63. ábrán szemléltetjük: 1. görbe: egy éjszakás inkubálás exoglikozidázok nélkül (csak Man-9); 2. görbe: egy éjszakás inkubálás  $\alpha$ 1-2 mannozidázzal (Man-5 és Man-6 elegye); 3. és 4. görbe: egy órás, illetve egy éjszakás inkubálás  $\alpha$ -mannozidázzal (csak 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz); egy éjszakás inkubálás  $\alpha$ - és  $\beta$ -mannozidázzal (csak kitobióz). A 63. ábrán a 6. görbe az alkalmazott oldószer-gradienst jelzi.  
30

A *Saccharomyces* sejtek által termelt E2s – PNGáz-F-fel végzett kezelést követően kapott - oligoszacharidjainak exoglikozidázok nélküli reakciótermékeiként döntően négy szén-

hidrát van jelen, melyek  $59 \pm 1$  percnél (15 %),  $67 \pm 1$  percnél (45 %),  $70 \pm 1$  percnél (25 %) és  $75 \pm 1$  percnél (15 %) eluálódnak. A *Saccharomyces* sejtekben termelődött Els összes Man(8)-GlcNAc(2) és Man(9)GlcNAc(2) tartalmaz kb. 65 % volt.  $\alpha$ 1-2 mannozidázzal végzett reakcióban csak a  $70 \pm 1$  perces retencioidővel jellemezhető szénhidrátok tűntek el. A  $75 \pm 1$  perces retencioidővel jellemezhető szénhidrát intenzitása változatlan maradt, míg a  $67 \pm 1$  perces retencioidőjű szénhidrát intenzitása nőtt. Ez azt jelenti, hogy nem mindegyik láncvégi mannóz-egység  $\alpha$ (1-2) konfigurációjú.  $\alpha$ -mannozidázzal végzett egy éjszakás inkubálást követően valamennyi szénhidrát-lánc 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz-gyökké redukálódik. Ez azt jelenti, hogy a szénhidrát magasabb polimerizációs fokú mannóz, és egy kivételével valamennyi mannózyök  $\alpha$ -konfigurációjú. A 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz-gyök kitobiózzá történő redukálódása  $\beta$ -mannozidázzal végzett egy éjszakás inkubálást követően egyértelműen megfigyelhető volt. A kapott kromatogramokat a 64. ábrán mutatjuk be – ezeket a 63. ábrán látható kromatogramoknál leírtakkal azonos feltételek mellett kaptuk. Az eredményeket a 9. táblázatban foglaljuk össze.

A fenti kísérleteket vaccinia vírussal fertőzött sejtek által termelt Els-proteinekkal elvégezve, meglepő módon, teljesen eltérő eredményeket kaptunk. Az enzimek nélküli „reakcióban” a szénhidrátok komplex elegye volt jelen (ld. a 65. ábrát és a 9. táblázatot). A összes monoszacharid(8)-GlcNAc(2) és monoszacharid(9)-GlcNAc(2) tartalom 37 % volt. Az  $\alpha$ 1-2 mannozidázzal végzett reakciót követően a  $70 \pm 1$  és  $59 \pm 1$  perces retencioidőjű szénhidrátok eltűntek.  $\alpha$ -mannozidázzal végzett egy éjszakás inkubálás után – a 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz termék mellett – a monoszacharid(6)-GlcNAc(2) jelentős hányada megmaradt, ami azt jelzi, hogy az egyik oligoszacharid-ág rezisztens az  $\alpha$ -mannozidáz hasításával szemben. Ez az N-kötött oligoszacharid Man $\alpha$ (1-2) végződésű ágához kötött egy vagy két glükózyök jelenlétével magyarázható. A 62. ábrán egy ilyen glükóztartalmú oligoszacharid szerkezetét mutatjuk be. A glükóztartalmú oligoszacharidok lehetséges reakciótermékeit a 10. táblázatban soroljuk fel. Mivel az  $\alpha$ 1-2 mannozidázos reakciót követően nem marad vissza Man-7-tel egyenértékű (azaz kilenc monoszacharidból álló) oligoszacharid, ezek a glükózyökök, minden valószínűség szerint, a 62. ábrán bemutatott oligoszacharid-struktúra B-ágához vannak kötődve. Mindeazonáltal, nem zárható ki az sem, hogy a 62. ábrán látható oligoszacharid mind az A-, mind a B-ága részlegesen glükóz-végződésű.

A 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz-gyök kitobiózzá történő redukciója a  $\beta$ -mannozidázzal végzett egy éjszakás inkubálást követően egyértelmű volt. A kromatogramokat – melyeket 63.

és 64. ábrán látható kromatogramoknál leírtakkal azonos feltételek mellett kaptunk - a 65. ábrán mutatjuk be.

A kapott eredményeket a 9. táblázatban foglaljuk össze.

Ugyanezeket a kísérleteket *Hansenula* sejtekben termeltetett Els-proteinnel is megismételtük, és ebben az esetben is teljesen eltérő képet kaptunk. Az enzimek nélküli „reakciót követően döntően két –  $67 \pm 2$  és  $70 \pm 1$  perces retencioidéjű – szénhidrát volt jelen, melyek a Man-8-nak, illetve Man-9-nek feleltek meg. A *Hansenula* sejtekben termeltetett Els-proteinben az összes Man(8)-GlcNAc(2) és Man(9)GlcNAc(2) tartalom hozzávetőleg 90 % volt.  $\alpha$ 1-2 mannozidázzal végzett reakciót követően a szénhidrátok főleg Man-5-té (retencioidó:  $45 \pm 1$  perc) és Man-6-tá (retencioidó:  $53 \pm 1$  perc) redukálódtak. Az  $\alpha$ -mannozidázzal végzett egy éjszakás inkubálás után valamennyi szénhidrát-lánc 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz-gyökké redukálódott, ami azt jelenti, hogy a szénhidrát magasabb polimerizációs fokú mannóz, és egy kivétellel valamennyi mannózyök  $\alpha$ -konfigurációjú.  $\beta$ -mannozidázzal egy éjszakán át végzett inkubálás után a 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz-gyök kitobiózzá történő redukciója egyértelmű volt.

A kromatogramokat – melyeket 63-65. ábrákon látható kromatogramoknál leírtakkal azonos feltételek mellett kaptunk - a 65. ábrán mutatjuk be. Az eredményeket a 9. táblázatban foglaljuk össze. A 9. táblázatban a különböző oligomannózokat kromatográfiás retencioidéjükkel („Rt”) együtt tüntetjük fel, és megadjuk az egyes oligomannózok összes oligomannóztartalomhoz viszonyított százalékos arányát (felső sorok), illetve – az 55-62. ábrák valamelyikére hivatkozva - az egyes kimutatott oligomannózok legvalószínűbb szerkezetét. A láncvégi  $\alpha$ 1-3 mannózokat tartalmazó oligomannózokat “°” jellel, míg a láncvégi glükózokat tartalmazó oligomannózokat “\*” jellel jelöljük. Az olyan hivatkozások, mint pl. a „62-ből\*”, azt jelentik, hogy az adott szerkezet a 62. ábrán bemutatott szerkezetből származtatható. A táblázatban „1” jelentése: exoglikozidázok nélküli „reakció”; „2” jelentése  $\alpha$ 1-2 mannozidázos reakció. A  $45 \pm 1$  perc retencioidéjű oligomannóz feltehetően olyan oligomannóz, amely egy kitobiózhoz kapcsolva öt mannózt tartalmaz. A  $75 \pm 1$  retencioidéjű

9. táblázat

Saccharomyces sejtek („Sc”) és Hansenula sejtek („Hp”) által termelt E1s-proteinekből, illetve HCV-rekombináns vaccinia vírussal fertőzött emlőseredetű sejtek („Vac”) által termelt E1s-proteinből származó oligomannózok emésztésével kapott oligomannózok

|                 | (Man-5)<br>Rt:45±1 | Man-6<br>Rt:53±1                | Man-7<br>Rt:59±1 | Man-8<br>Rt:67±1                | Man-9<br>Rt:70±1            | (Man-10)<br>Rt:75±1        |
|-----------------|--------------------|---------------------------------|------------------|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Sc 1<br>Szerk.  | /                  | 1 %<br>55/D                     | 14 %<br>55/C     | 42 %<br>59°                     | 23 %<br>57°<br>61°          | 18 %<br>56°                |
| Sc 2            | 17 %<br>55/E       | /                               | 8 %<br>60°       | 50 %<br>59°                     | 6 %<br>57°<br>61°           | 16 %<br>56°                |
| Vac 1<br>Szerk. | 3 %<br>55/E        | 32 %<br>62-ből*<br>és 10. tábl. | 20 %<br>55/C     | 23 %<br>62-ből*<br>és 10. tábl. | 14 %<br>62*<br>és 10. tábl. | 5 %<br>62*<br>és 10. tábl. |
| Vac 1<br>Szerk: | 74 %<br>55/E       | 2 %<br>62-ből* és<br>10. tábl.  | /                | 20 %<br>62-ből* és<br>10. tábl. | 4 %<br>62*<br>és 10. tábl.  | /<br>62*<br>és 10. tábl.   |
| Hp 1<br>Szerk.  | /                  | 2 %<br>55/D                     | 7 %<br>55/C      | 54 %<br>55/B                    | 36 %<br>58                  | /                          |
| Hp 2<br>Szerk.  | 80 %<br>55/E       | 20 %<br>55/D                    | /                | /                               | /                           | /                          |

## 10. táblázat

Glükóztartalmú, N-kötött oligoszacharidok  $\alpha$ 1-2 mannozidázzal vagy  $\alpha$ 1-2 mannozidázzal és  $\alpha$ -mannozidázzal végzett reakciót követően kapott termékei

|               | Man-ekvivalens | $\alpha$ 1-2 mannozidáz termék (1) | $\alpha$ -mannozidáz termék [(1) után] |
|---------------|----------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| „A” ág + 2Glc | Man-10         | Man-8                              | Man-6                                  |
| „A” ág + 1Glc | Man-9          | Man-7                              | Man-6                                  |
| „A” ág, 0 Glc | Man-8          | Man-5                              | 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz         |
| „B” ág + 2Glc | Man-10         | Man-9                              | Man-6                                  |
| „B” ág + 1Glc | Man-9          | Man-8                              | Man-6                                  |
| „B” ág, 0 Glc | Man-8          | Man-5                              | 4'- $\beta$ -mannozil-kitobióz         |

## 5 27. példa

N-glikozilációs helyek foglaltságának meghatározása rekombináns HCV-E1-proteinben

Az E1s-protein SDS-PAGE-analízis során – az elfoglalt N-glikozilációs helyek mennyiségétől függően – különböző migrációs viselkedést mutat, így e tulajdonság alapján megbecsülhető az E1-termékben lévő elfoglalt N-glikozilációs helyek átlagos mennyisége. Kísérletünk során tisztított E1-terméket SDS-PAGE-gélelektroforézisnek vetettük alá, a gél

10 „Coomassie Brilliant” kékkel festettük (67. ábra), majd „ImageMaster 1D Prime” szoftvercsomag (Pharmacia) alkalmazásával analizáltuk. Röviden összefoglalva: a gél beszkeneltük, és mindegyik specifikus proteincsíkra meghatároztuk a %-os előfordulást (vagyis az egyes csíkok intenzitásának összes csík-intenzitásra vonatkoztatott arányát, miáltal az egyes csíkok összege

15 100 %; ld. 11. táblázat). Megjegyezzük, hogy minden egyes specifikus proteincsík olyan E1s-molekulákat reprezentál, amelyek azonos számú foglalt N-glikozilációs helyet tartalmaznak.

A kapott eredmények azt jelzik, hogy a *Hansenula* sejtekben termelődött E1-termék döntő hányadában (>90 %) az elfoglalt N-glikozilációs helyek száma egy vagy több különbséggel kisebb, mint a vaccinia expressziós rendszerben termeltetett E1s foglalt N-glikozilációs

20 helyeinek száma (WO 96/04385). Feltételezve, hogy a vaccinia-eredetű E1-termék valamennyi N-glikozilációs helye foglalt [ahol is az E1 233-236. pozíciójában elhelyezkedő „NNSS” szekvenciát (73. azonosítószámú szekvencia) egy glikozilációs helynek tekintjük] nagy biztonsággal

következtethetünk arra, hogy a *Hansenula* sejtekben termelt E1-protein elfoglalt N-glikozilációs helyeinek átlagos száma nem haladja meg az összes rendelkezésre álló N-glikozilációs hely 80 %-át.

5

# 11. táblázat

*Hansenula polymorpha* és vaccinia/vero expressziós rendszerben termeltetett E1-proteinek foglalt N-glikozilációs helyei átlagos számának megállapítása SDS-PAGE analízissel és „Coomassie Brilliant” kék festődési intenzitási analízissel (ld. a 67. ábrát)

| Alkilezett Els              | % -os előfordulás (relatív intenzitás) |             |
|-----------------------------|----------------------------------------|-------------|
|                             | 1. kísérlet                            | 2. kísérlet |
| <i>Hansenula polymorpha</i> |                                        |             |
| $M_r = 29$                  | 9                                      | 8           |
| $M_r = 25$                  | 25                                     | 27          |
| $M_r = 21$                  | 38                                     | 42          |
| $M_r = 18$                  | 27                                     | 22          |
| $M_r = 14-15$               | nem mértük                             | nem mértük  |
| Vaccinia/Vero               |                                        |             |
| $M_r = 29$                  | 100                                    | 100         |

## 28. példa

### N-glikozilációs helyek foglaltságának meghatározása rekombináns HCV-E2-proteinben

A *Hansenula* sejtekben termeltetett E2-H6-protein 200 µg-ját PNGáz-F-fel deglikoziláltuk, majd a deglikozilált E2s-H6-proteint mini-gélre (10 µg/sáv) vittük fel. A proteincsíkokat tripszinnel és endo-Asp-N-nel emésztettük. Az így kapott peptidek molekulatömegét Maldi-tömegspektrometriával (száritott csepp és vékonyréteg eljárás) határoztuk meg.

15

Ez az eljárás felhasználható az N-glikoziláció mértékének megállapítására: a PNGáz-F enzimmel végzett deglikoziláció során a teljes cukorlánc lehasításra kerül, ugyanakkor, az aszparagin (N) aszparaginsavvá (D) hidrolizálódik. E két aminosav molekulatömegének különbsége 1 Da, ami tömegspektrometriával meghatározható. Ezen túlmenően, az N→D hidrolízis az Asp-N enzim számára új hasítási helyet hoz létre.

20

Az E2s-protein lehetséges glikozilációs helyei a következők: N<sub>417</sub>, N<sub>423</sub>, N<sub>430</sub>, N<sub>448</sub>, N<sub>478</sub>, N<sub>532</sub>, N<sub>540</sub>, N<sub>556</sub>, N<sub>576</sub>, N<sub>623</sub> és N<sub>645</sub> (ld. 68. ábra). Maldi-tömegspektrometriás analízissel kimutattuk, hogy e glikozilációs helyeken az N-glikoziláció nem volt teljes, mivel a PNGáz-F-

fel végzett deglikozilációt követően olyan peptideket találtunk, amelyek a glikozilációs helyen aszparagint vagy –aszparaginsavat tartalmaztak (1 Da). Az aszparaginsavak számának aszparaginok számához viszonyított arányából (a *Hansenula* sejtekben expresszált, és a vizsgált mintában jelen lévő összes E2-protein vonatkozásában) következtethetünk egy bizonyos N-glikozilációs hely cukorlánccal való foglaltságára. Ezeket az eredményeket a 12., 13. és 14. táblázatban foglaljuk össze.

A kapott eredményekből kiszámítottuk, hogy átlagosan minden egyes glikozilációs hely kb. 54 %-ban volt glikozilált.

10

12. táblázat

Tripszines hasítással létrehozott, egy N-glikozilációs helyet tartalmazó peptidekből meghatározott százalékos glikoziláltság

| N-glikozilációs hely | Glikozilált | Nem glikozilált |
|----------------------|-------------|-----------------|
| N430                 | 60 %        | 40 %            |
| N448                 | 50 %        | 50 %            |
| N556                 | 80 %        | 20 %            |
| N576                 | 90 %        | 10 %            |
| N623                 | 20 %        | 80 %            |
| N645                 | 10 %        | 90 %            |

13. táblázat

15 Tripszines hasítással létrehozott, két N-glikozilációs helyet tartalmazó peptidekből meghatározott százalékos glikoziláltság

| N-glikozilációs helyek | Mindkét hely glikozilált | Két helyből egy glikozilált | Egyik hely sem glikozilált | Egy helyre számított glikoziláltság |
|------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| N417 és N423           | 70 %                     | 25 %                        | 5 %                        | 85 %                                |
| N532 és N540           | 0 %                      | 80 %                        | 20 %                       | 40 %                                |

14. táblázat

Asp-N emésztéssel kapott peptidekben az N478 pozícióra meghatározott százalékos glikoziláltság

| N-glikozilációs hely | Glikozilált | Nem glikozilált |
|----------------------|-------------|-----------------|
| N478                 | 35 %        | 65 %            |

5 29. példa

Véradóktól nyert szérumok reaktivitása *Saccharomyces* vagy *Hansenula* sejtek által termelt HCV-E1-proteinnel

A *Saccharomyces* sejtek által termelt ( $\alpha$ MF-vezetőszekvenciával expresszált) E1s-H6-proteint és a *Hansenula* sejtek által termelt (CL-vezetőszekvenciával expresszált) E1s-H6-proteint a 15. és 16. példában leírtak szerint tisztítottuk, majd alkileztük, és vírusszerű részecskéket hoztunk létre (ld. a 20. példát). Mindkét proteint 0,5  $\mu$ g/mL koncentrációban, 37 °C-on egy órás inkubálással mikrotiter-tálcán rögzítettük, majd a tálcát 0,1 % kazeint tartalmazó foszfátpufferelt sóoldattal 37 °C-on egy óra hosszat blokkoltuk, és a tálcán - HCV-re szkrínelt és negatívnak bizonyult - véradóktól származó szérumokat 37 °C-on, 1/20 hígításban (foszfátpufferelt sóoldat, 0,5 % kazein, 10 % (m/V) szacharóz, 0,2 % (V/V) Triton X-705) egy óra hosszat inkubáltunk. A kötődést második antitestként – peroxidázhoz kapcsolt - nyúl eredetű anti-humán IgG-Fc specifikus antiszérum (Dako, Dánia) 1/50000 hígításával (0,1 % kazeint tartalmazó foszfátpufferelt sóoldatban) szobahőmérsékleten egy óra hosszat végzett inkubálással, majd színelőhívással detektáltuk. Az egyes lépések között a tálcákat 0,05 % (m/V) Tween-20-at tartalmazó foszfátpufferelt sóoldattal háromszor mostuk. Összehasonlítás céljából a szérumokat azonos módon, emlőseredetű sejtől származó – Depla és mtsai. leírása szerint (WO 99/67285 számú nemzetközi közzétételi irat) termeltetett és tisztított - E1s-proteinnel is analizáltuk.

Az ELISA-teszt küszöbértékeként a háttérérték (azaz az összes szérum azonos feltételek mellett, de sztreptavidinnel bevont üregekben meghatározott reaktivitása) átlagának kétszeresét alkalmaztuk.

A 15. táblázat adatai alapján látható, hogy sok (75 %) szérum küszöbérték feletti reaktivitást mutatott a *Saccharomyces* sejtekben termelt E1-proteinre, míg a *Hansenula* által termelt E1-proteinre küszöbérték feletti reaktivitást csak kevés szérum (6 %) adott. Ez reaktivitásbeli különbség a láncvégi  $\alpha$ 1-3 mannózok jelenlétének tulajdonítható, amelyek a

*Saccharomyces* által termelt E1-proteinen lévő  $\alpha$ 1-2 mannózekhez kötődnek (ld. 26. példa). Korábban Young és mtsai. (1998) már jelezték, hogy ez a mannóz-típus felelős a humán szérumok *Saccharomyces*-eredetű mannánnal bekövetkező reakciójáért is. Annak igazolása céljából, hogy a *Saccharomyces*-eredetű E1-proteinnel megvalósuló reaktivitás ilyen típusú mannóz-gyököknek tudható be, a *Saccharomyces* sejtek által termelt E1-proteinnel végzett ELISA-tesztet olyan véradó-szérum hígításaival ismételtük meg, amelyeket a hígítópufferhez adott 1 mg/mL vagy 5 mg/mL mannánnal (Sigma) 37 °C-on egy óra hosszat előinkubáltunk. A 16. táblázat adatai alapján látható, hogy a mannánnal végzett előinkubálás koncentrációfüggő módon, az összes vizsgált szérum esetében (az F556 kivételével) háttérszintre csökkentette a *Saccharomyces* sejtekben termelt E1-protein véradóktól nyert szérummal megvalósuló reakcióját (a kompetíció nélkül kapott 0,24 OD-érték 5 mg/mL mannánnal végzett előinkubálással 0,06-re csökkent).

15. táblázat

15 *Hansenula*, *Saccharomyces* és emlőseredetű sejtek által termelt E1-protein reaktivitása (a küszöbszinten felüli reaktivitási értékeket fekete mezőben tüntetjük fel)

| Szérum száma | <i>Hansenula</i><br>E1 | <i>Saccharomyces</i><br>E1 | Emlős<br>E1 | Kontroll |
|--------------|------------------------|----------------------------|-------------|----------|
| F552         | 0,18                   | 0,224                      | 0,056       | 0,05     |
| F553         | 0,062                  | 0,449                      | 0,056       | 0,052    |
| F555         | 0,06                   | 0,079                      | 0,054       | 0,051    |
| F556         | 0,073                  | 0,679                      | 0,054       | 0,051    |
| F557         | 0,059                  | 0,173                      | 0,053       | 0,05     |
| F558         | 0,066                  | 0,232                      | 0,06        | 0,058    |
| F559         | 0,084                  | 0,309                      | 0,056       | 0,053    |
| F560         | 0,062                  | 0,338                      | 0,052       | 0,052    |
| F562         | 0,056                  | 0,128                      | 0,053       | 0,053    |
| F563         | 0,064                  | 0,181                      | 0,059       | 0,056    |
| F570         | 0,056                  | 0,135                      | 0,054       | 0,055    |
| F571         | 0,06                   | 0,209                      | 0,054       | 0,055    |
| F572         | 0,061                  | 0,427                      | 0,055       | 0,056    |

- 107 -

|                                           |       |       |       |        |       |
|-------------------------------------------|-------|-------|-------|--------|-------|
| F575                                      | 0,079 | 0,104 | 0,062 |        | 0,056 |
| F576                                      | 0,061 | 0,144 | 0,058 |        | 0,057 |
| F577                                      | 0,063 | 0,224 | 0,055 |        | 0,058 |
| F578                                      | 0,089 | 0,131 | 0,057 |        | 0,061 |
| F581                                      | 0,064 | 0,098 | 0,061 |        | 0,057 |
| F594                                      | 0,055 | 0,116 | 0,056 |        | 0,057 |
| F595                                      | 0,059 | 0,539 | 0,057 |        | 0,058 |
| F598                                      | 0,076 | 0,311 | 0,056 |        | 0,059 |
| F450                                      | 0,205 | 0,078 | 0,099 |        | 0,059 |
| F453                                      | 0,059 | 0,128 | 0,057 |        | 0,06  |
| F456                                      | 0,058 | 0,121 | 0,056 |        | 0,06  |
| F458                                      | 0,055 | 0,088 | 0,054 |        | 0,054 |
| F459                                      | 0,054 | 0,069 | 0,056 |        | 0,054 |
| F463                                      | 0,055 | 0,083 | 0,054 |        | 0,056 |
| F466                                      | 0,086 | 0,208 | 0,071 |        | 0,094 |
| F467                                      | 0,066 | 0,344 | 0,055 |        | 0,055 |
| F469                                      | 0,059 | 0,074 | 0,057 |        | 0,057 |
| F470                                      | 0,074 | 0,222 | 0,056 |        | 0,056 |
| F473                                      | 0,094 | 0,807 | 0,054 |        | 0,057 |
| F479                                      | 0,06  | 0,075 | 0,06  |        | 0,051 |
| F480                                      | 0,053 | 0,305 | 0,056 |        | 0,053 |
| F481                                      | 0,059 | 0,395 | 0,071 |        | 0,052 |
| F488                                      | 0,063 | 0,467 | 0,059 |        | 0,053 |
| átlag                                     | 0,072 | 0,242 | 0,058 | küszöb | 0,113 |
| küszöb feletti<br>szérumok szá-<br>ma     | 2/36  | 27/36 | 0/36  |        |       |
| küszöb feletti<br>szérumok szá-<br>zaléka | 6     | 75    |       |        |       |

16. táblázat

Saccharomyces sejtek által termelt E1-protein 15. táblázatnál leírt feltételekkel, de 5 mg/mL mannán jelenlétében vizsgált reaktivitása (a küszöbszinten felüli reaktivitási értékeket fekete mezőben tüntetjük fel)

5

| Szérum száma | Mannán-koncentráció |         |         |
|--------------|---------------------|---------|---------|
|              | 0 mg/mL             | 1 mg/mL | 5 mg/mL |
| F552         | 0,207               | 0,128   | 0,103   |
| F553         | 0,487               | 0,098   | 0,050   |
| F555         | 0,066               | 0,044   | 0,041   |
| F556         | 0,769               | 0,540   | 0,372   |
| F557         | 0,158               | 0,094   | 0,088   |
| F558         | 0,250               | 0,076   | 0,046   |
| F559         | 0,300               | 0,077   | 0,066   |
| F560         | 0,356               | 0,088   | 0,044   |
| F562         | 0,122               | 0,106   | 0,089   |
| F563         | 0,164               | 0,091   | 0,049   |
| F570         | 0,110               | 0,043   | 0,040   |
| F571         | 0,212               | 0,057   | 0,042   |
| F572         | 0,464               | 0,087   | 0,043,  |
| F575         | 0,095               | 0,081   | 0,062   |
| F576         | 0,138               | 0,042   | 0,043   |
| F577         | 0,216               | 0,042   | 0,041   |
| F578         | 0,125               | 0,100   | 0,093   |
| F581         | 0,083               | 0,064   | 0,042   |
| F594         | 0,102               | 0,044   | 0,041   |
| F595         | 0,520               | 0,088   | 0,044   |
| F598         | 0,340               | 0,054   | 0,042   |
| F450         | 0,053               | 0,060   | 0,053   |
| F453         | 0,116               | 0,049   | 0,044   |
| F456         | 0,112               | 0,050   | 0,043   |

- 109 -

|       |       |         |         |
|-------|-------|---------|---------|
| F458  | 0,086 | 0,051   | 0,042   |
| F459  | 0,054 | 0,044   | 0,042   |
| F463  | 0,078 | 0,043   | 0,041   |
| F466  | 0,172 | 0,111   | 0,085   |
| F467  | 0,420 | 0,117   | 0,049   |
| F469  | 0,053 | 0,043   | 0,041   |
| F470  | 0,220 | 0,070   | 0,061   |
| F473  | 0,924 | 0,183   | 0,063   |
| F479  | 0,059 | 0,049   | 0,043   |
| F480  | 0,281 | 0,155   | 0,054   |
| F481  | 0,355 | 0,042   | 0,046   |
| F488  | 0,474 | 0,090 ' | 0,046 , |
| átlag | 0,243 | 0,089   | 0,062   |

A szekvencialistában található kötetlen szövegek (<223>) fordítása

az 1. azonosítószámú szekvenciához:

- <222> (2)..(2)
- 5      <223> Xaa jelentése: Arg, Lys vagy Val;  
          <222> (3)..(3)  
          <223> Xaa jelentése: Ser, Ala, Val, Arg vagy Met;  
          <222> (4)..(4)  
          <223> Xaa jelentése: Leu vagy Phe;
- 10      <222> (5)..(5)  
          <223> Xaa jelentése: Leu vagy Ala;  
          <222> (6)..(6)  
          <223> Xaa jelentése: Ile, Thr, Phe vagy Val;  
          <222> (7)..(7)
- 15      <223> Xaa jelentése: Leu, Phe vagy Ala;  
          <222> (8)..(8)  
          <223> Xaa jelentése: Val, Ile, Ala, Leu vagy Cys;  
          <222> (9)..(9)  
          <223> Xaa jelentése: Leu, Phe, Ala vagy Ile;
- 20      <222> (10)..(10)  
          <223> Xaa jelentése: Cys, Phe, Ser vagy Leu;  
          <222> (11)..(11)  
          <223> Xaa jelentése: Phe, Leu, Ser vagy Pro;  
          <222> (12)..(12)
- 25      <223> Xaa jelentése: Leu, Ala vagy Met;  
          <222> (13)..(13)  
          <223> Xaa jelentése: Pro, Ala vagy Ile;  
          <222> (14)..(14)  
          <223> Xaa jelentése: Leu vagy Ala;
- 30      <222> (15)..(15)  
          <223> Xaa jelentése: Ala, Val, Ser vagy Met;  
          <222> (16)..(16)

<223> Xaa jelentése: Ala, Lys vagy Ser;

<222> (17)..(17)

<223> Xaa jelentése: Leu, Pro, Gln vagy Ile;

a 6. azonosítószámú szekvenciához:

5 <223> pGEMTE1sH6-vektor;

a 7. és 8. azonosítószámú szekvenciához:

<223> szintetikus próba vagy láncindító-oligonukleotid;

a 9. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pCHH-Hir-vektor;

10 a 10. és 11. azonosítószámú szekvenciához:

<223> szintetikus próba vagy láncindító-oligonukleotid;

a 12. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pFPMT121-vektor;

a 13. azonosítószámú szekvenciához:

15 <223> pFPMT-CHH-E1H6-vektor;

a 14. és 15. azonosítószámú szekvenciához:

<223> szintetikus próba vagy láncindító-oligonukleotid;

a 16. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pFPMT-Mfalfa-E1-H6-vektor;

20 a 17. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pUC18-FMD-MFalfa-E1-H6-vektor;

<222> (1207)..(1208)

<223> N jelentése: tetszőleges nukleotid;

<222> (1386)..(1387)

25 <223> N jelentése: tetszőleges nukleotid;

a 18. és 19. azonosítószámú szekvenciához:

<223> szintetikus próba vagy láncindító-oligonukleotid;

a 20. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pUC18-FMD-CL-E1-H6-vektor;

30 <222> (1006)..(1007)

<223> N jelentése: tetszőleges nukleotid;

<222> (1185)..(1186)

<223> N jelentése: tetszőleges nukleotid;

a 21. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pFPMT-CL-E1-H6-vektor;

a 22. azonosítószámú szekvenciához:

5 <223> pSP72E2H6-vektor;

a 23. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pMPT121-vektor;

<222> (777)..(778)

<223> N jelentése: tetszőleges nukleotid;

10 a 24. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pFMPT-MFalfa-E2-H6-vektor;

a 25. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pMPT-Mfalfa-E2-H6-vektor;

<222> (2103)..(2103)

15 <223> N jelentése: tetszőleges nukleotid;

a 26. és 27. azonosítószámú szekvenciához:

<223> szintetikus próba vagy láncindító-oligonukleotid;

a 28. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pMF30-vektor;

20 a 29-31. azonosítószámú szekvenciákhoz:

<223> szintetikus próba vagy láncindító-oligonukleotid;

a 32. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pFMPT-CL-E2-H6-vektor;

a 33. és 34. azonosítószámú szekvenciához:

25 <223> szintetikus próba vagy láncindító-oligonukleotid;

a 35. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pUC18-FMD-CL-E1-vektor;

<222> (988)..(989)

<223> N jelentése: tetszőleges nukleotid;

30 <222> (1167)..(1168)

<223> N jelentése: tetszőleges nukleotid;

a 36. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pFPMT-CL-E1-vektor;

a 37. és 38. azonosítószámú szekvenciához:

<223> szintetikus próba vagy láncindító-oligonukleotid;

a 39. azonosítószámú szekvenciához:

5 <223> pUC18-FMD-CL-E1-H-K6-vektor;

<222> (1027)..(1028)

<223> N jelentése: tetszőleges nukleotid;

<222> (1206)..(1207)

<223> N jelentése: tetszőleges nukleotid;

10 a 40. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pFPMT-CL-H6-K-E1-vektor;

<222> (1098)..(1099)

<223> N jelentése: tetszőleges nukleotid;

<222> (1277)..(1278)

15 <223> N jelentése: tetszőleges nukleotid;

a 41. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pYIG5-vektor;

a 42. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pYIG5E1H6-vektor;

20 a 43. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pSY1-vektor;

a 44. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pSY1AMFE1sH6a-vektor;

a 45. azonosítószámú szekvenciához:

25 <223> pBKS-E2sH6-vektor;

a 46. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pYIG5HCCL-22aH6-vektor;

a 47. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pYYIGSE2H6-vektor;

30 a 48. azonosítószámú szekvenciához:

<223> pYIG7-vektor;

a 49. azonosítószámú szekvenciához:

- <223> pYIG7E1-vektor;  
 az 50. azonosítószámú szekvenciához:  
 <223> pSY1YIG7E1s-vektor;  
 az 51. azonosítószámú szekvenciához:  
 5 <223> pPICZalphaA-vektor;  
 az 52. azonosítószámú szekvenciához:  
 <223> pPICZalphaD'-vektor;  
 az 53. azonosítószámú szekvenciához:  
 <223> pPICZalphaE'-vektor;  
 10 az 54-57. azonosítószámú szekvenciákhoz:  
 <223> szintetikus próba vagy láncindító-oligonukleotid;  
 az 58. azonosítószámú szekvenciához:  
 <223> pPICZalphaD'-E1sH6-vektor;  
 az 59. azonosítószámú szekvenciához:  
 15 <223> pPICZalphaE'-E1sH6-vektor;  
 a 60. azonosítószámú szekvenciához:  
 <223> pPICZalphaD'-E2sH6-vektor;  
 a 61. azonosítószámú szekvenciához:  
 <223> pPICZalphaE'-E2sH6-vektor;  
 20 a 62. azonosítószámú szekvenciához:  
 <223> pUC18Mfa-vektor;  
 a 63-65. azonosítószámú szekvenciákhoz:  
 <223> adapterpeptid;  
 a 66-68. azonosítószámú szekvenciákhoz:  
 25 <223> „processing” hely;  
 <222> (5)..(5)  
 <223> X jelentése: tetszőleges aminosav;  
 a 69-72. azonosítószámú szekvenciákhoz:  
 <223> adapterpeptid;  
 30 a 73. azonosítószámú szekvenciához:  
 <223> HCV E1;  
 a 74. azonosítószámú szekvenciához:  
 <223> FLAG-epitóp;

- a 75. azonosítószámú szekvenciához:  
 <223> Protein-C epitóp;
- a 76. azonosítószámú szekvenciához:  
 <223> VSV-epitóp;
- 5 a 77. azonosítószámú szekvenciához:  
 <223> streptag;
- a 78. azonosítószámú szekvenciához:  
 <223> Tag100-epitóp;
- a 79. azonosítószámú szekvenciához:  
 10 <223> c-myc-epitóp;
- a 80-82. azonosítószámú szekvenciákhoz:  
 <223> HA-epitóp;
- a 83. azonosítószámú szekvenciához:  
 <223> trombin hasítási hely;
- 15 a 84. azonosítószámú szekvenciához:  
 <223> kollagenáz felismerési hely;  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa jelentése: tetszőleges (de leggyakrabban semleges) aminosav.

Hivatkozások listája

- Agaphonov,M.O., Beburov,M.Y., Ter Avanesyan,M.D., and Smirnov,V.N. (1995) A disruption-replacement approach for the targeted integration of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 11:1241-1247.
- Agaphonov,M.O., Trushkina,P.M., Sohn,J.H., Choi,E.S., Rhee,S.K., and Ter Avanesyan,M.D. (1999) Vectors for rapid selection of integrants with different plasmid copy numbers in the yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *Yeast* 15:541-551.
- Alber,T. and Kawasaki,G. (1982) Nucleotide sequence of the triose phosphate isomerase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Mol Appl.Genet* 1:419-434.
- Ammerer,G. (1983) Expression of genes in yeast using the ADCl promoter. *Methods Enzymol.* 101:192-201.
- Ballou,L., Hitzeman,R.A., Lewis,M.S., and Ballou,C.E. (1991) Vanadate-resistant yeast mutants are defective in protein glycosylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:3209-3212.
- Beekman,N.J., Schaaper,W.M., Tesser,G.I., Dalsgaard,K., Kamstrup,S., Langeveld,J.P., Boshuizen,R.S., and Meloen,R.H. (1997) Synthetic peptide vaccines: palmitoylation of peptide antigens by a thioester bond increases immunogenicity. *J.Pept.Res.* 50:357-364.
- Burns,J., Butler,J., and Whitesides,G. (1991) Selective reduction of disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phosphine. *J.Org.Chem.* 56:2648-2650.
- Cox,H., Mead,D., Sudbery,P., Eland,R.M., Mannazzu,L., and Evans,L. (2000) Constitutive expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* using the PMA1 promoter. *Yeast* 16:1191-1203.
- Cregg,J.M. (1999) Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In *Gene expression systems: using nature for the art of expression*, J.M.Fernandez and J.P.Hoeffler, eds (San Diego: Academic Press), pp. 157-191.
- Darbre,A. (1986) *Practical protein chemistry: a handbook*. Wiley & Sons Ltd.

- Diminsky,D., Schirmbeck,R., Reimann,J., and Barenholz,Y.** (1997) Comparison between hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles derived from mammalian cells (CHO) and yeast cells (*Hansenula polymorpha*): composition, structure and immunogenicity. *Vaccine* **15**:637-647.
- Doms,R.W., Lamb,R.A., Rose,J.K., and Helenius,A.** (1993) Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* **193**:545-562.
- Elble,R.** (1992) A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13**:18-20.
- Fellinger,A.J., Verbakel,J.M., Veale,R.A., Sudbery,P.E., Bom,I.J., Overbeeke,N., and Verrips,C.T.** (1991) Expression of the alpha-galactosidase from *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) by *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **7**:463-473.
- Fournillier,J.A., Cahour,A., Escrion,N., Girad,M., and Wychowski,C.** (1996) Processing of the E1 glycoprotein of hepatitis C virus expressed in mammalian cells. *J.Gen Virol.* **77** ( Pt 5):1055-1064.
- Gallit,J.** (1993) Restoring free sulfhydryl groups in synthetic peptides. *Anal.Biochem.* **214**:334-335.
- Garson,J.A., Lubach,D., Passas,J., Whitby,K., and Grant,P.R.** (1999) Suramin blocks hepatitis C binding to human hepatoma cells in vitro. *J.Med.Virol.* **57**:238-242.
- Gatzke,R., Weydemann,U., Janowicz,Z.A., and Hollenberg,C.P.** (1995) Stable multicopy integration of vector sequences in *Hansenula polymorpha*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **43**:844-849.
- Gellissen,G.** (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **54**:741-750.
- Grakoui,A., Wychowski,C., Lin,C., Feinstone,S.M., and Rice,C.M.** (1993) Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J.Virol.* **67**:1385-1395.
- Grinna,L.S. and Tschopp,J.F.** (1989) Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast* **5**:107-115.

- Heile, J.M., Fong, Y.L., Rosa, D., Berger, K., Saletti, G., Campagnoli, S., Bensi, G., Capo, S., Coates, S., Crawford, K., Dong, C., Wininger, M., Baker, G., Cousens, L., Chien, D., Ng, P., Archangel, P., Grandi, G., Houghton, M., and Abrignani, S.** (2000) Evaluation of hepatitis C virus glycoprotein E2 for vaccine design: an endoplasmic reticulum-retained recombinant protein is superior to secreted recombinant protein and DNA-based vaccine candidates. *J. Virol.* 74:6885-6892.
- Helenius, A.** (1994) How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol. Cell* 5:253-265.
- Hermanson, G.T.** (1996) *Bioconjugate techniques*. San Diego: Academic Press.
- Herscovics, A. and Orlean, P.** (1993) Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.* 7:540-550.
- Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., and Shimotohno, K.** (1991) Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88:5547-5551.
- Hitzeman, R.A., Clarke, L., and Carbon, J.** (1980) Isolation and characterization of the yeast 3-phosphoglycerokinase gene (PGK) by an immunological screening technique. *J. Biol. Chem.* 255:12073-12080.
- Hollenberg, C.P. and Gellissen, G.** (1997) Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:554-560.
- Holmgren, A.** (1979) Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.* 254:9627-9632.
- Janowicz, Z.A., Melber, K., Merckelbach, A., Jacobs, E., Harford, N., Comberbach, M., and Hollenberg, C.P.** (1991) Simultaneous expression of the S and L surface antigens of hepatitis B, and formation of mixed particles in the methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 7:431-443.

- Jayabaskaran,C., Davison,P.F., and Paulus,H. (1987) Facile preparation and some applications of an affinity matrix with a cleavable connector arm containing a disulfide bond. *Prep.Biochem.* **17**:121-141.
- Jenkins,N., Parekh,R.B., and James,D.C. (1996) Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat.Biotechnol.* **14**:975-981.
- Julius,D., Brake,A., Blair,L., Kunisawa,R., and Thorner,J. (1984) Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* **37**:1075-1089.
- Kalef,E., Walfish,P.G., and Gitler,C. (1993) Arsenical-based affinity chromatography of vicinal dithiol-containing proteins: purification of L1210 leukemia cytoplasmic proteins and the recombinant rat c-erb A beta 1 T3 receptor. *Anal.Biochem.* **212**:325-334.
- Kalidas,C., Joshi,L., and Batt,C. (2001) Characterization of glycosylated variants of beta-lactoglobulin expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Eng* **14**:201-207.
- Kato,N., Ootsuyama,Y., Tanaka,T., Nakagawa,M., Nakazawa,T., Muraiso,K., Ohkoshi,S., Hijikata,M., and Shimotohno,K. (1992) Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses. *Virus Res.* **22**:107-123.
- Kawasaki,G. and Fraenkel,D.G. (1982) Cloning of yeast glycolysis genes by complementation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **108**:1107-1122.
- Klebe,R.J., Harriss,J.V., Sharp,Z.D., and Douglas,M.G. (1983) A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* **25**:333-341.
- Kumar,N., Kella,D., and Kinsella,J.E. (1985) A method for the controlled cleavage of disulfide bonds in proteins in the absence of denaturants. *J.Biochem.Biophys.Methods* **11**:251-263.
- Kumar,N., Kella,D., and Kinsella,J.E. (1986) Anomalous effects of denaturants on sulfitolysis of protein disulfide bonds. *Int.J.Peptide Prot.Res.* **28**:586-592.

- Maertens,G. and Stuyver,L.** (1997) Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus. In *The molecular medicine of viral hepatitis*, T.J.Harrison and A.J.Zuckerman, eds John Wiley & Sons), pp. 183-233.
- Major,M.E. and Feinstone,S.M.** (1997) The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 25:1527-1538.
- Miele,R.G., Nilsen,S.L., Brito,T., Bretthauer,R.K., and Castellino,F.J.** (1997) Glycosylation properties of the *Pichia pastoris*-expressed recombinant kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator. *Biotechnol.Appl.Biochem.* 25 ( Pt 2):151-157.
- Meunier,J.C., Fournillier,A., Choukhi,A., Cahour,A., Cocquerel,L., Dubuisson,J., and Wychowski,C.** (1999) Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *J.Gen Virol.* 80 ( Pt 4):887-896.
- Montesino,R., Garcia,R., Quintero,O., and Cremata,J.A.** (1998) Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr.Purif.* 14:197-207.
- Mustilli,A.C., Izzo,E., Houghton,M., and Galeotti,C.L.** (1999) Comparison of secretion of a hepatitis C virus glycoprotein in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Res.Microbiol.* 150:179-187.
- Nagai,K. and Thogersen,H.C.** (1984) Generation of beta-globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Nature* 309:810-812.
- Nielsen,P.E.** (2001) Targeting double stranded DNA with peptide nucleic acid (PNA). *Curr Med Chem* 8:545-550.
- Okabayashi,K., Nakagawa,Y., Hayasuke,N., Ohi,H., Miura,M., Ishida,Y., Shimizu,M., Murakami,K., Hirabayashi,K., Minamino,H., and .** (1991) Secretory expression of the human serum albumin gene in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biochem.(Tokyo)* 110:103-110.

- Orum,H. and Wengel,J.** (2001) Locked nucleic acids: a promising molecular family for gene-function analysis and antisense drug development. *Curr Opin.Mol.Ther.* 3:239-243.
- Padgett,K.A. and Sorge,J.A.** (1996) Creating seamless junctions independent of restriction sites in PCR cloning. *Gene* 168:31-35.
- Panchal,T. and Wodzinski,R.J.** (1998) Comparison of glycosylation patterns of phytase from *Aspergillus niger* (A. ficuum) NRRL 3135 and recombinant phytase. *Prep.Biochem.Biotechnol.* 28:201-217.
- Pedersen,J., Lauritzen,C., Madsen,M.T., and Weis,D.S.** (1999) Removal of N-terminal polyhistidine tags from recombinant proteins using engineered aminopeptidases. *Protein Expr.Purif.* 15:389-400.
- Pomroy,N.C. and Deber,C.M.** (1998) Solubilization of hydrophobic peptides by reversible cysteine PEGylation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 245:618-621.
- Raymond,C.K.** (1999) Recombinant protein expression in *Pichia methanolica*. In *Gene expression systems: using nature for the art of expression*, J.M.Fernandez and J.P.Hoeffler, eds (San Diego: Academic Press), pp. 193-209.
- Rein,A., Ott,D.E., Mirro,J., Arthur,L.O., Rice,W., and Henderson,L.E.** (1996) Inactivation of murine leukemia virus by compounds that react with the zinc finger in the viral nucleocapsid protein. *J.Virol.* 70:4966-4972.
- Roggenkamp,R., Hansen,H., Eckart,M., Janowicz,Z., and Hollenberg,C.P.** (1986) Transformation of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* by autonomous replication and integration vectors. *Mol Gen Genet* 202:302-308.
- Rosa,D., Campagnoli,S., Moretto,C., Guenzi,E., Cousens,L., Chin,M., Dong,C., Weiner,A.J., Lau,J.Y., Choo,Q.L., Chien,D., Pileri,P., Houghton,M., and Abrignani,S.** (1996) A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:1759-1763.
- Rose,J.K. and Doms,R.W.** (1988) Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum. *Annu.Rev.Cell Biol.* 4:257-288.

- Russell,D.W., Smith,M., Williamson,V.M., and Young,E.T.** (1983) Nucleotide sequence of the yeast alcohol dehydrogenase II gene. *J.Biol.Chem.* **258**:2674-2682.
- Russell,P.R.** (1983) Evolutionary divergence of the mRNA transcription initiation mechanism in yeast. *Nature* **301**:167-169.
- Russell,P.R.** (1985) Transcription of the triose-phosphate-isomerase gene of *Schizosaccharomyces pombe* initiates from a start point different from that in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **40**:125-130.
- Russell,P.R. and Hall,B.D.** (1983) The primary structure of the alcohol dehydrogenase gene from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J.Biol.Chem.* **258**:143-149.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scorer,C.A., Clare,J.J., McCombie,W.R., Romanos,M.A., and Sreekrishna,K.** (1994) Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Biotechnology (N.Y.)* **12**:181-184.
- Singh,R. and Kats,L.** (1995) Catalysis of reduction of disulfide by selenol. *Anal.Biochem.* **232**:86-91.
- Sohn,J.H., Choi,E.S., Kang,H.A., Rhee,J.S., and Rhee,S.K.** (1999) A family of telomere-associated autonomously replicating sequences and their functions in targeted recombination in *Hansenula polymorpha* DL-1. *J.Bacteriol.* **181**:1005-1013.
- Stuyver,L., van Arnhem,W., Wyseur,A., Hernandez,F., Delaporte,E., and Maertens,G.** (1994) Classification of hepatitis C viruses based on phylogenetic analysis of the envelope 1 and nonstructural 5B regions and identification of five additional subtypes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**:10134-10138.
- Sugrue,R.J., Cui,T., Xu,Q., Fu,J., and Chan,Y.C.** (1997) The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *J.Virol.Methods* **69**:159-169.
- Thakur,M.L., DeFulvio,J., Richard,M.D., and Park,C.H.** (1991) Technetium-99m labeled monoclonal antibodies: evaluation of reducing agents. *Int.J.Rad.Appl.Instrum.B* **18**:227-233.

**Trimble,R.B., Atkinson,P.H., Tschopp,J.F., Townsend,R.R., and Maley,F. (1991)** Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces SUC2* invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J.Biol.Chem.* 266:22807-22817.

**Vingerhoeds,M.H., Haisma,H.J., Belliot,S.O., Smit,R.H., Crommelin,D.J., and Storm,G. (1996)** Immunoliposomes as enzyme-carriers (immuno-enzymosomes) for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): optimization of prodrug activating capacity. *Pharm.Res.* 13:604-610.

**Wahlestedt,C., Salmi,P., Good,L., Kela,J., Johnsson,T., Hokfelt,T., Broberger,C., Porreca,F., Lai,J., Ren,K., Ossipov,M., Koshkin,A., Jakobsen,N., Skouv,J., Oerum,H., Jacobsen,M.H., and Wengel,J. (2000)** Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5633-5638.

**Weydemann,U., Keup,P., Piontek,M., Strasser,A.W., Schweden,J., Gellissen,G., and Janowicz,Z.A. (1995)** High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha*--authentic processing of three different preprohirudins. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 44:377-385.

**Young, M., Davies, M.J., Bailey, D., Gradwell, M.J., Smestad-Paulsen, B., Wold, J.K., Barnes, R.M.R., Hounsell, E. (1998)** Characterization of oligosaccharides from an antigenic mannan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycoconjugate Journal* 15:815-822.

**Zauberman, A., Nussbaum, O., Ilan, E., Eren, R., Ben-Moshe, O., Arazi, Y., Berre, S., Lubin, I., Shouval, D., Galun, E., Reisner, Y., and Dagan, S. (1999)** The trimera mouse system: a mouse model for hepatitis C infection and evaluation of therapeutic agents. 6th International Symposium on hepatitis C and related viruses. Bethesda 6-9 June, 1999.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Izolált HCV-burokprotein vagy legalább egy N-glikozilációs helyet tartalmazó fragmense, mely protein vagy fragmens eukarióta sejtekben végzett expresszáltatás terméke,  
5 továbbá N-glikozilációs helyeinek átlagosan legfeljebb 80 %-a „core”-glikozilált.
2. Az 1. igénypont szerinti izolált HCV-burokprotein vagy fragmense, mely protein vagy fragmens „core”-glikozilált helyeinek több, mint 70 %-a 8-10 mannózt tartalmazó oligomannózzal van glikozilálva.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti HCV-burokprotein vagy fragmense, amelyben a  
10 Man(7)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal „core”-glikozilált helyek számának Man(8)-GlcNAc(2) szerkezetű oligomannózzal „core”-glikozilált helyek számához viszonyított aránya legfeljebb 0,45.
4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti izolált HCV-burokprotein vagy fragmense, amely protein vagy fragmens „core”-glikozilált helyei 10 %-nál kevesebb láncvégi  $\alpha$ 1,3-mannózt tartalmazó oligomannózzal vannak glikozilálva.  
15
5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti izolált HCV-burokprotein vagy részlete, amely élesztősejtekben végzett expresszáltatás terméke.
6. Az 5. igénypont szerinti izolált HCV-burokprotein vagy részlete, amely *Hansenula* sejtben végzett expresszáltatás terméke.
7. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti izolált HCV-burokprotein vagy részlete, amely – a HCV-burokproteinhez vagy fragmenséhez kapcsolva madáreredetű lizozim-vezetőpeptidet vagy annak funkcionális részletét tartalmazó – proteinből származik.  
20
8. A 7. igénypont szerinti izolált HCV-burokprotein vagy részlete, amely a következő szerkezetű proteinből származik:  
25  $CL-[(A1)_a-(PS1)_b-(A2)_c]-HCVENV-[(A3)_d-(PS2)_e-(A4)_f]$   
amelyben „CL” jelentése: madáreredetű lizozim vezetőszekvenciája vagy funkcionális megfelelője;  
„A1”, „A2”, „A3” és „A4” jelentése: adapterpeptidek, amelyek azonosak vagy különbözőek;  
„PS1” és „PS2” jelentése: érési („processing”) helyek, melyek azonosak vagy különbözőek;  
30 „HCVENV” jelentése: HCV-burokprotein vagy részlete;  
„a”, „b”, „c”, „d”, „e” és „f” értéke: 0 vagy 1; és  
adott esetben, A1 és/vagy A2 a PS1 részét képezi, és/vagy A3 és/vagy A4 a PS2 részét képezi.

9. A 8. igénypont szerinti izolált HCV-burokprotein vagy fragmense, amely madár-eredetű lizozim-vezetőpeptidként (CL) 1. azonosítószámú aminosav-szekvenciát tartalmazó vezetőpeptidet tartalmazó proteinből származik.

10. A 8. igénypont szerinti izolált HCV-burokprotein vagy részlete, amely olyan proteinből származik, amelyben „A” jelentése a 63-65., 70-72. vagy 74-82. azonosítószámú aminosav-szekvenciák egyikét tartalmazza; „PS” jelentése a 66-68. vagy 83-84. azonosítószámú aminosav-szekvenciák egyikét tartalmazza, vagy „PS” jelentése kétbázisos hely (pl. Lys-Lys, Arg-Arg, Lys-Arg vagy Arg-Lys) vagy egybázisos hely (pl. Lys), és „HCVENV” jelentése a 85-98. azonosítószámú aminosav-szekvenciák egyikét vagy fragmensét tartalmazza.

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti izolált HCV-burokprotein vagy fragmense, amely monomer, homodimer, heterodimer, homo-oligomer vagy hetero-oligomer szerkezetű.

12. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti izolált HCV-burokprotein vagy fragmense, amely vírusszerű részecskében van elhelyezve.

13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti izolált HCV-burokprotein vagy fragmense, amely kémiaiilag módosított cisztein-tiolcsoportokat tartalmaz.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti izolált HCV-burokprotein vagy fragmense, amely antigénhatású.

15. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti izolált HCV-burokprotein vagy fragmense, amely immunogén tulajdonságú.

16. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti izolált HCV-burokprotein vagy fragmense, amely T-sejt-epitópot tartalmaz.

17. Készítmény, amely 1-16. igénypontok bármelyike szerinti izolált HCV-burokproteint vagy -proteinfragmenst tartalmaz.

18. A 17. igénypont szerinti készítmény, amely további komponensként gyógyászati szempontból elfogadható hordozót tartalmaz, és amely gyógyszer.

19. A 17. igénypont szerinti készítmény, amely további komponensként gyógyászati szempontból elfogadható hordozót tartalmaz, és amely vakcina.

20. Eljárás 1-16. igénypontok bármelyike szerinti izolált HCV-burokprotein vagy fragmense előállítására.

21. Eljárás anti-HCV antitestek jelenlétének – feltételezhetően anti-HCV antitesteket tartalmazó - mintában történő kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy

(i) az 1-16. igénypontok bármelyike szerinti HCV-burokproteint vagy részletét olyan feltételek mellett érintkeztetjük a mintával, amelyek lehetővé teszik a HCV-burokprotein vagy részlete anti-HCV antitestekkel történő komplexálódását;

(ii) kimutatjuk az (i) lépésben kialakult komplexet; és

5 (iii) az (ii) lépésben végzett kimutatás alapján következtetünk az anti-HCV antitestek jelenlétére a mintában.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (i) lépésében az érintkeztetést kompetitív feltételek mellett végezzük.

10 23. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a HCV-burokproteint vagy részletét szilárd hordozóhoz kapcsolva érintkeztetjük a mintával.

24. Diagnosztikai készlet anti-HCV antitestek jelenlétének – feltételezhetően anti-HCV antitesteket tartalmazó – mintában történő kimutatására, mely készlet 1-16. igénypontok bármelyike szerinti HCV-burokproteint vagy –proteinrészletet tartalmaz.

15 25. A 24. igénypont szerinti diagnosztikai készlet, amely a HCV-burokproteint vagy részletét szilárd hordozóhoz kapcsolva tartalmazza.

26. Gyógyszer, amely 1-16. igénypontok bármelyike szerinti HCV-burokproteint vagy –proteinrészletet tartalmaz.

27. Vakcina, amely 1-16. igénypontok bármelyike szerinti HCV-burokproteint vagy –proteinrészletet tartalmaz.

20 28. Gyógyászati készítmény HCV-specifikus immunreakció emlősbén történő indukálására, mely készítmény 1-16. igénypontok bármelyike szerinti HCV-burokprotein vagy –proteinrészlet hatásos mennyiségét, és – adott esetben - gyógyászati szempontból elfogadható adjuvánst tartalmaz.

25 29. Gyógyászati készítmény HCV-specifikus antitestek termelődésének emlősbén történő indukálására, mely készítmény 1-16. igénypontok bármelyike szerinti HCV-burokprotein vagy –proteinrészlet hatásos mennyiségét, és – adott esetben - gyógyászati szempontból elfogadható adjuvánst tartalmaz.

30 30. Gyógyászati készítmény T-sejt-funkció emlősbén történő indukálására, mely készítmény 1-16. igénypontok bármelyike szerinti HCV-burokprotein vagy –proteinrészlet hatásos mennyiségét, és – adott esetben - gyógyászati szempontból elfogadható adjuvánst tartalmaz.

31. A 28-30. igénypontok bármelyike szerinti gyógyászati készítmény, amely profilaktikus készítmény.

- 127 -

32. A 28-30. igénypontok bármelyike szerinti gyógyászati készítmény, amely terápiás készítmény.

33. A 28-32. igénypontok bármelyike szerinti gyógyászati készítmény, amely emberek kezelésére alkalmazható.

5

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

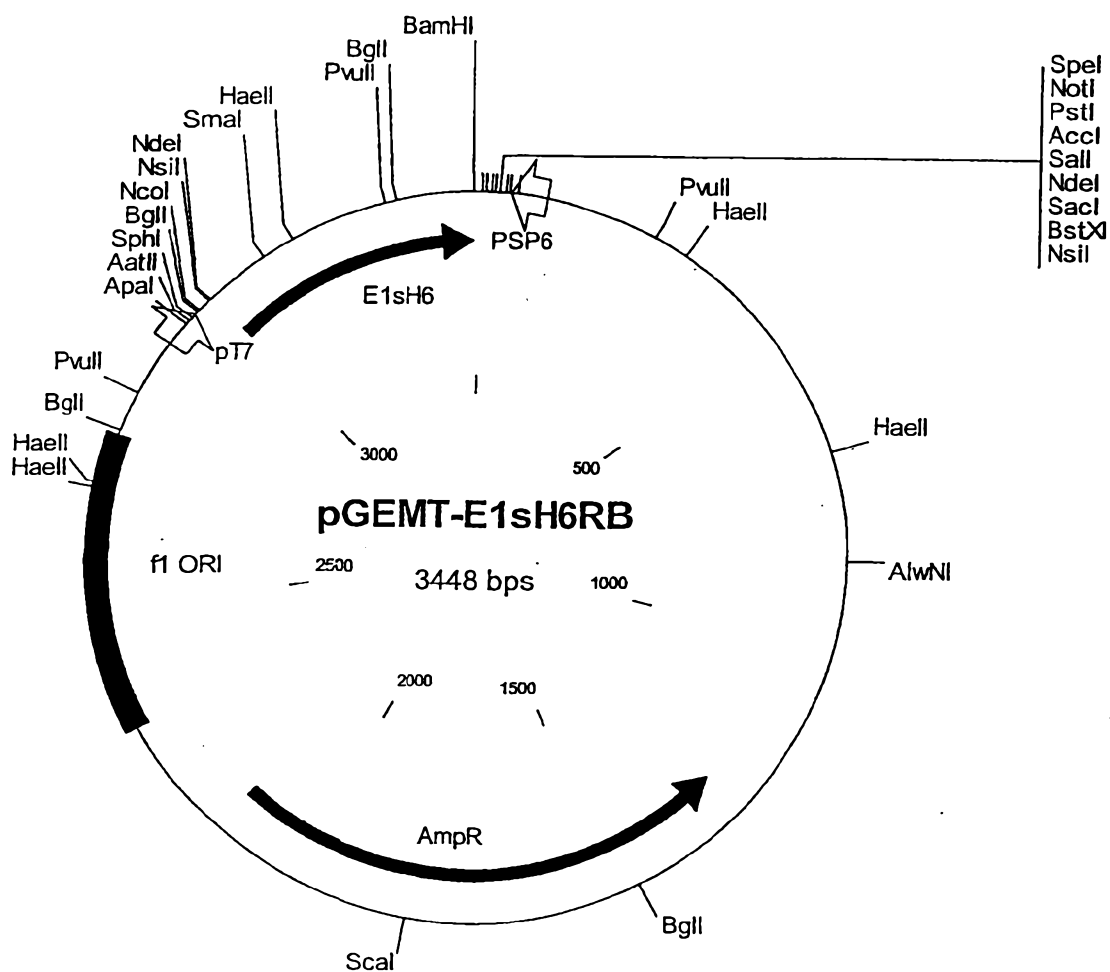
10



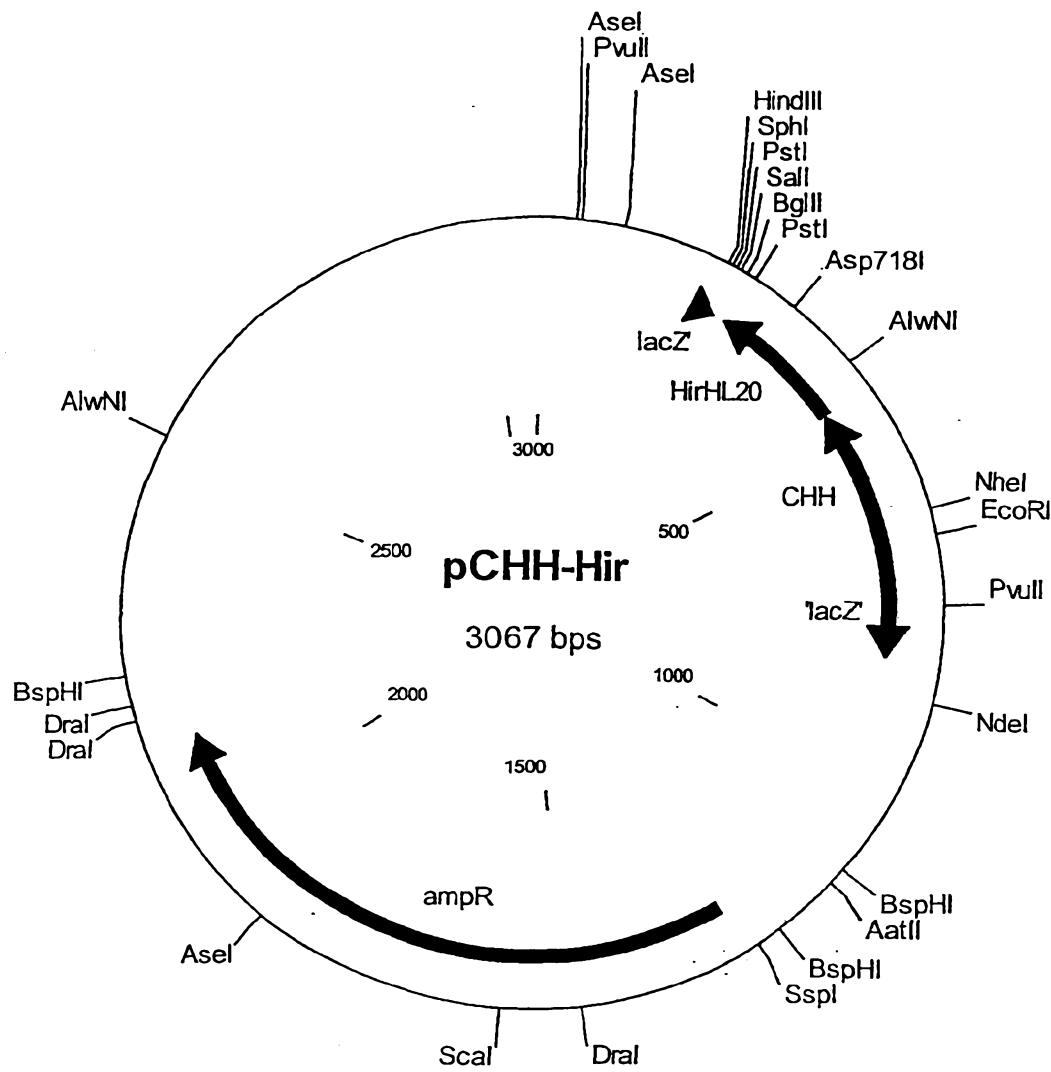
Lengyel Zsolt

szabadalmi ügyvivőjelölt

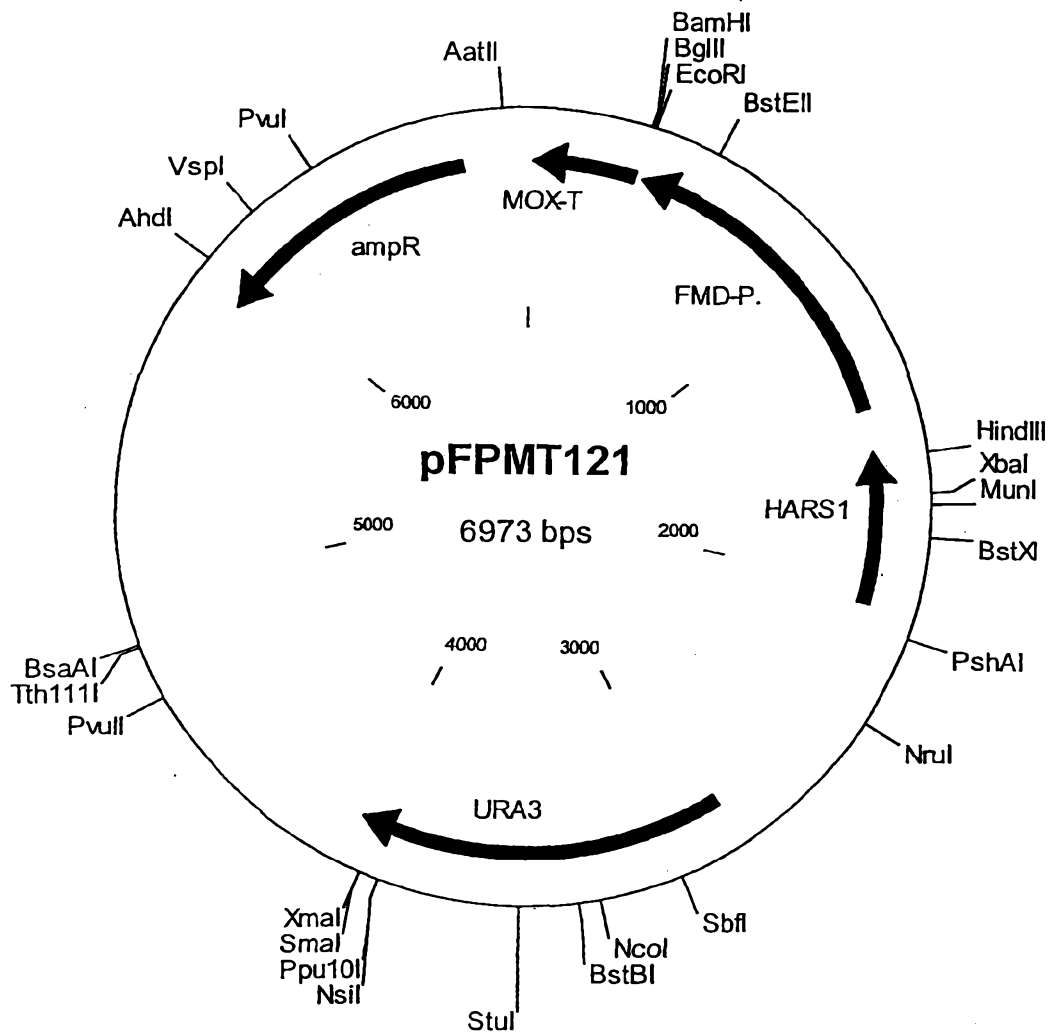
Revis



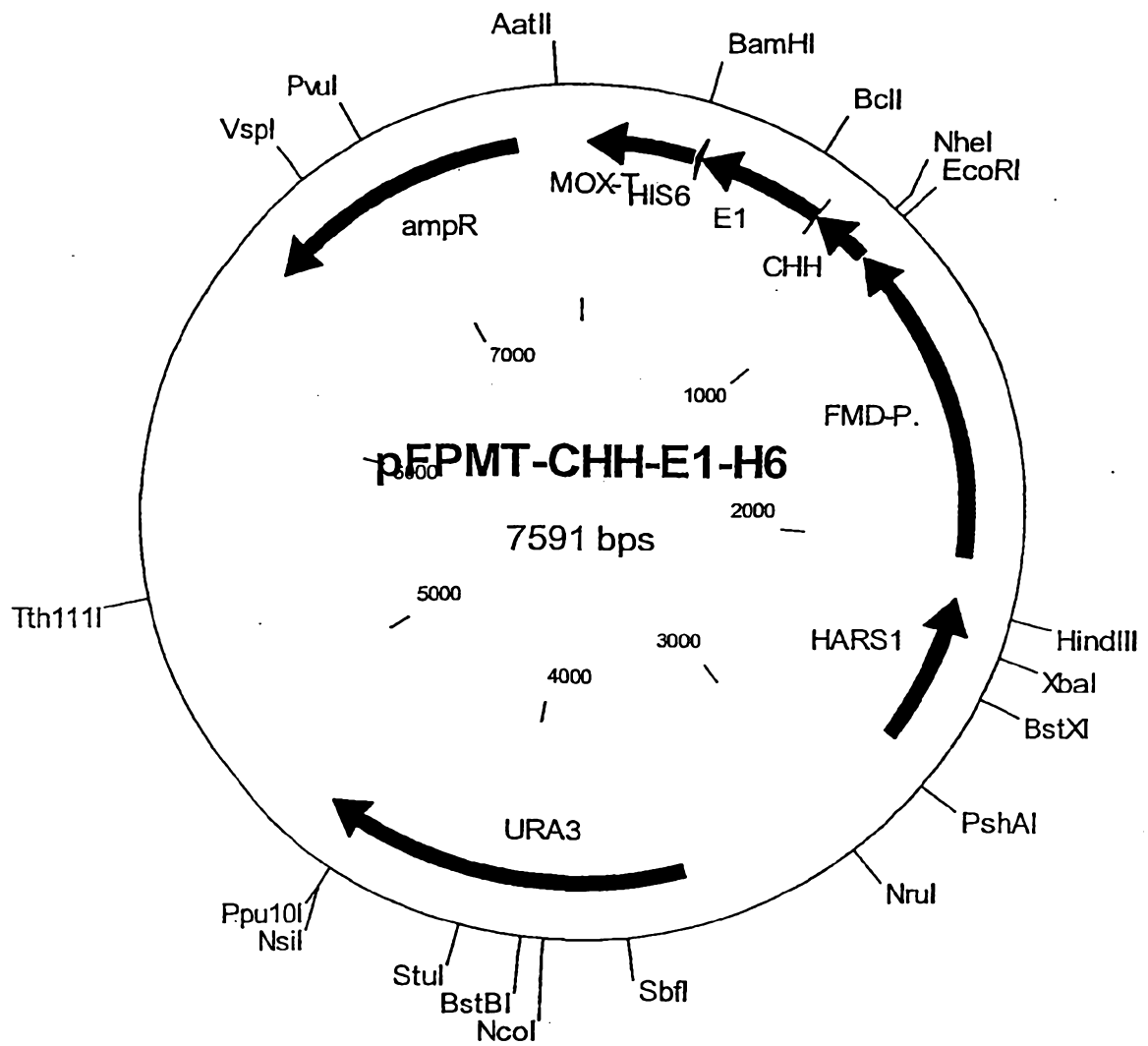
1. ábra



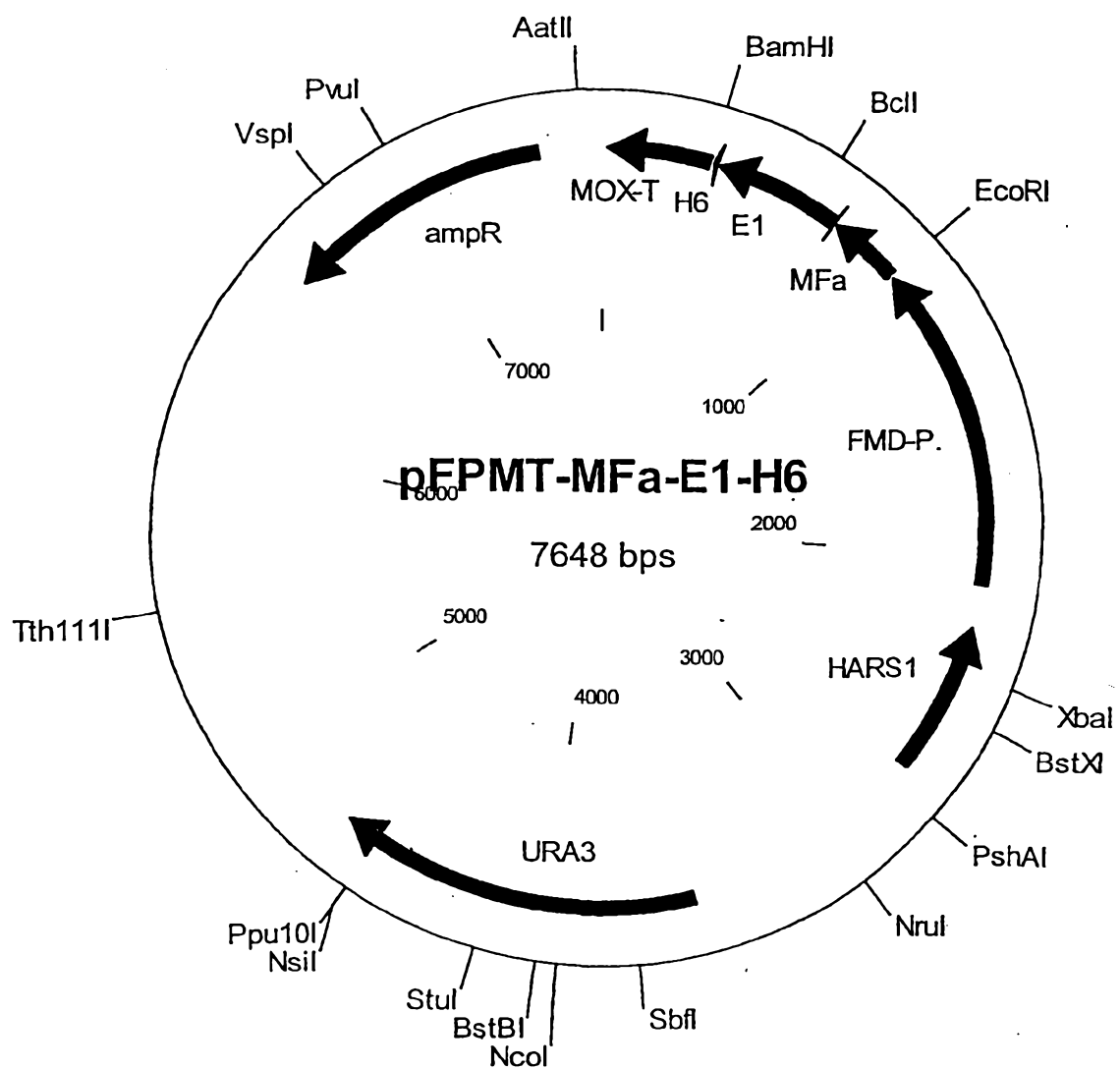
2. ábra



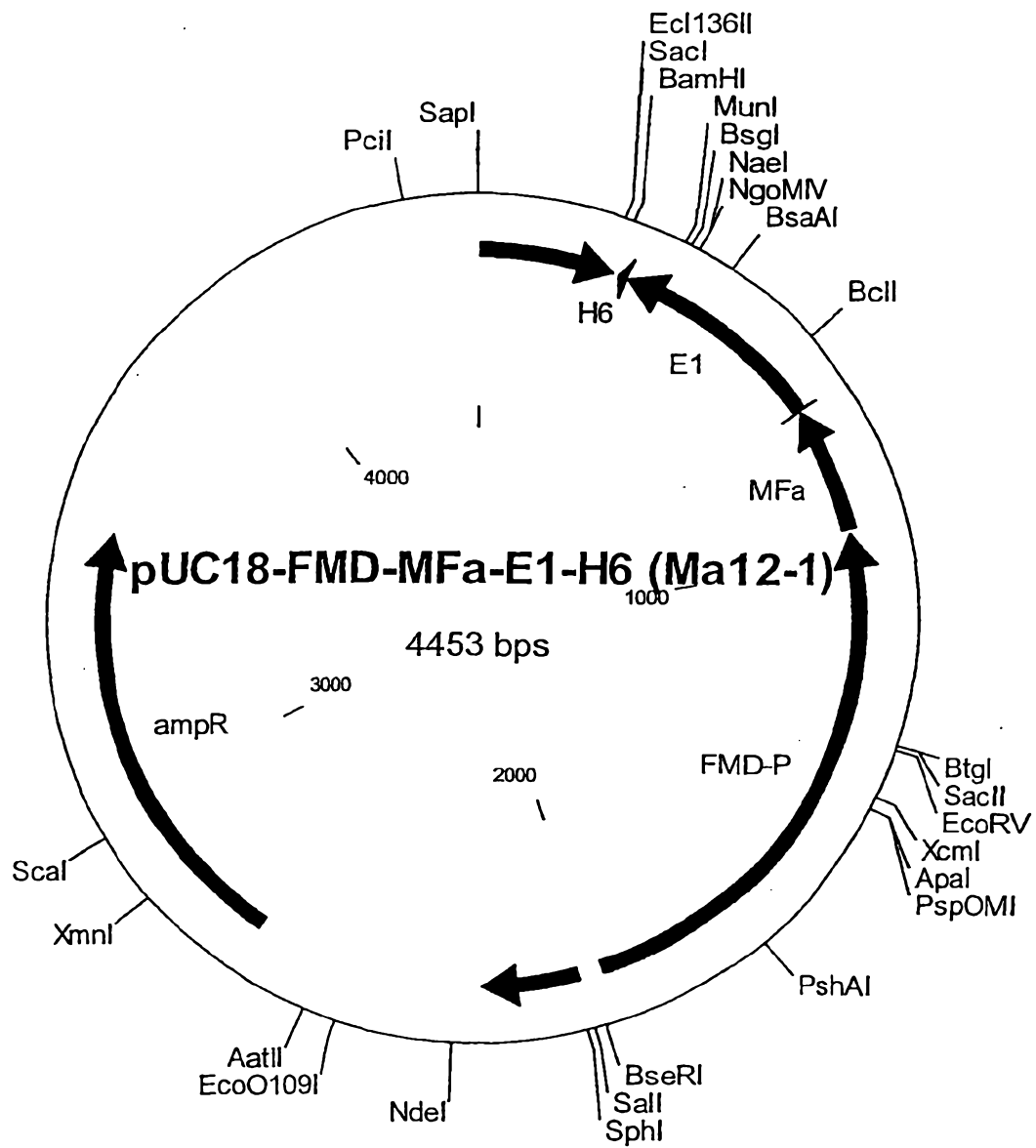
3. ábra



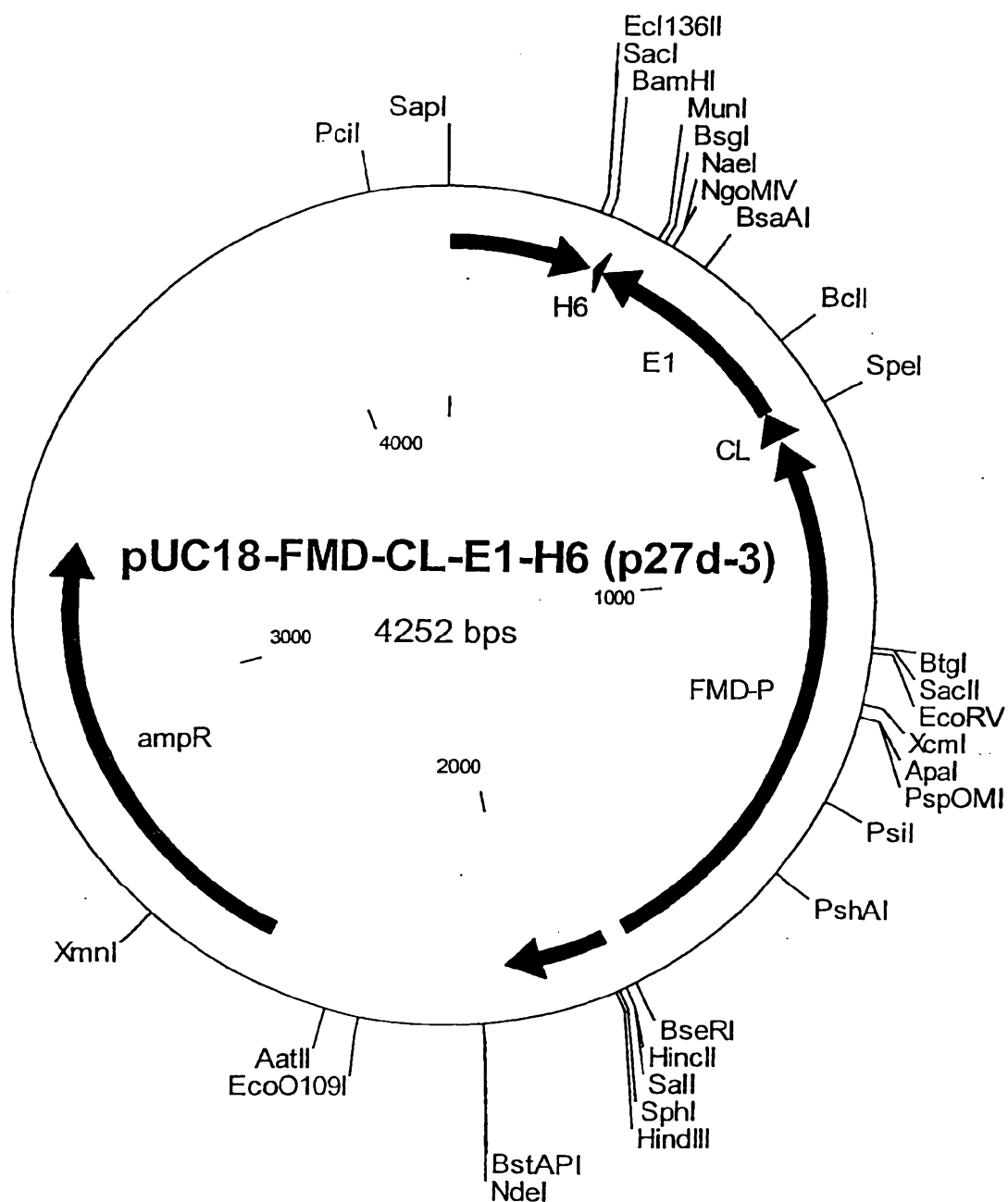
4. ábra



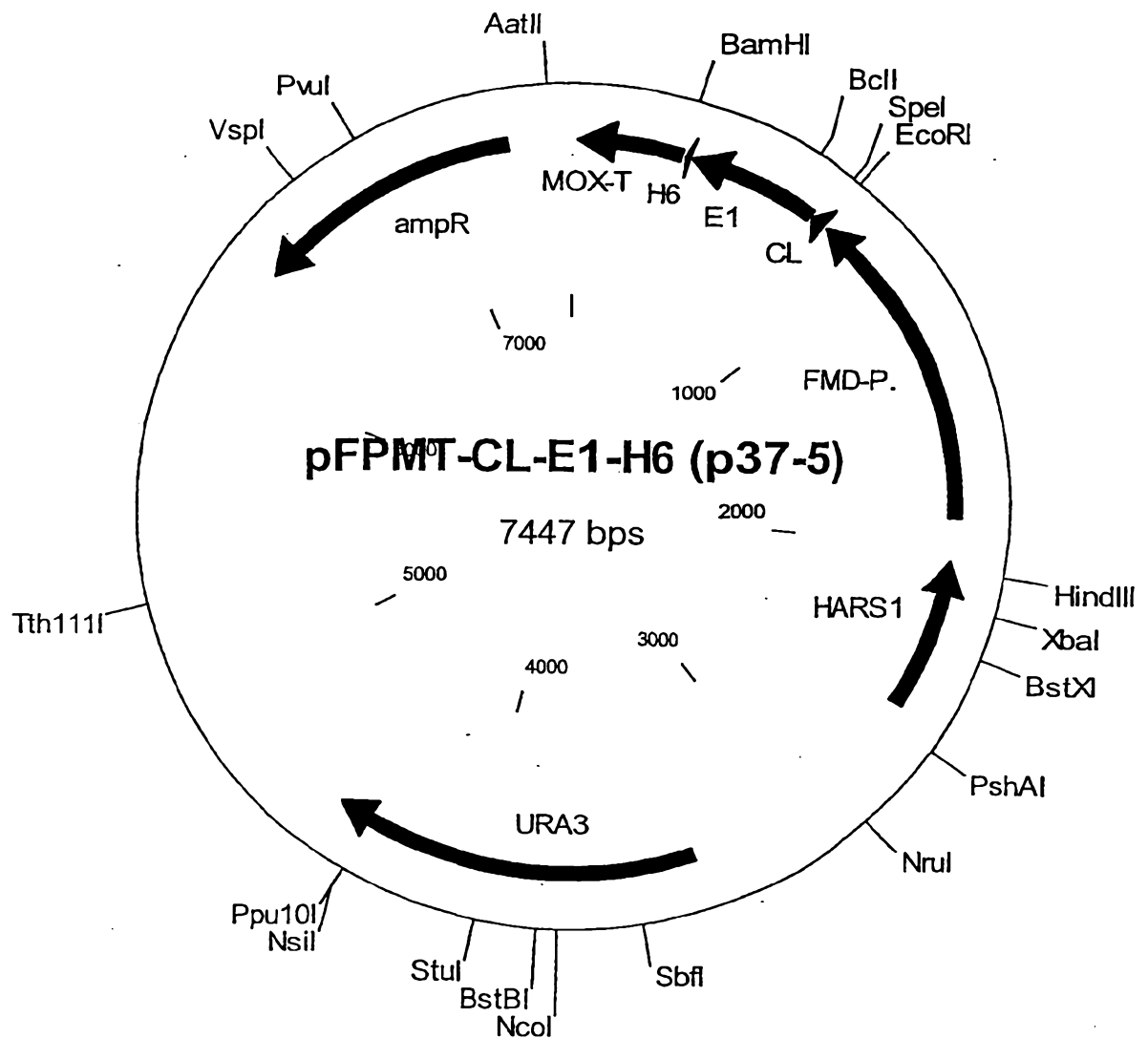
5. ábra



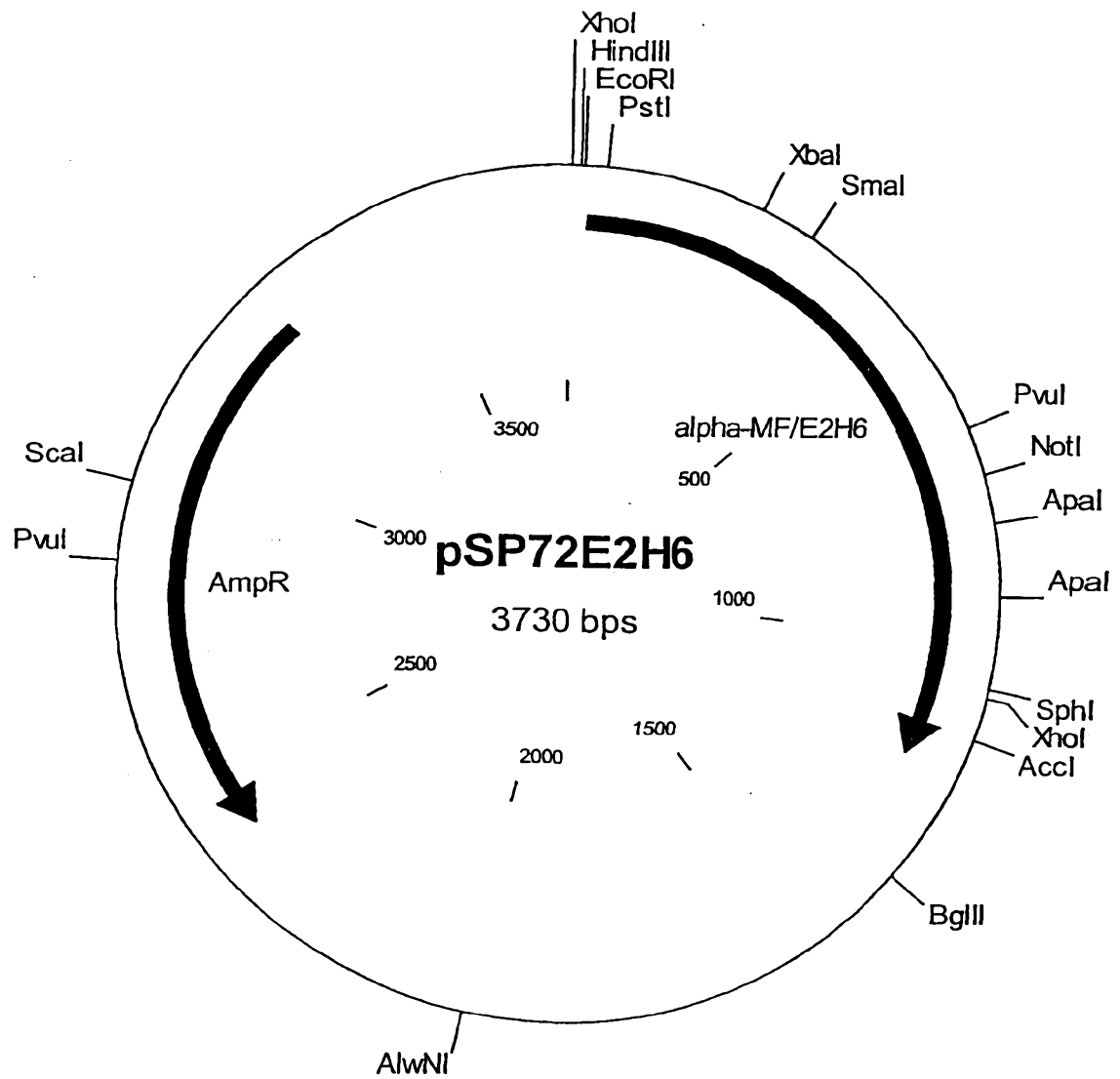
6. ábra



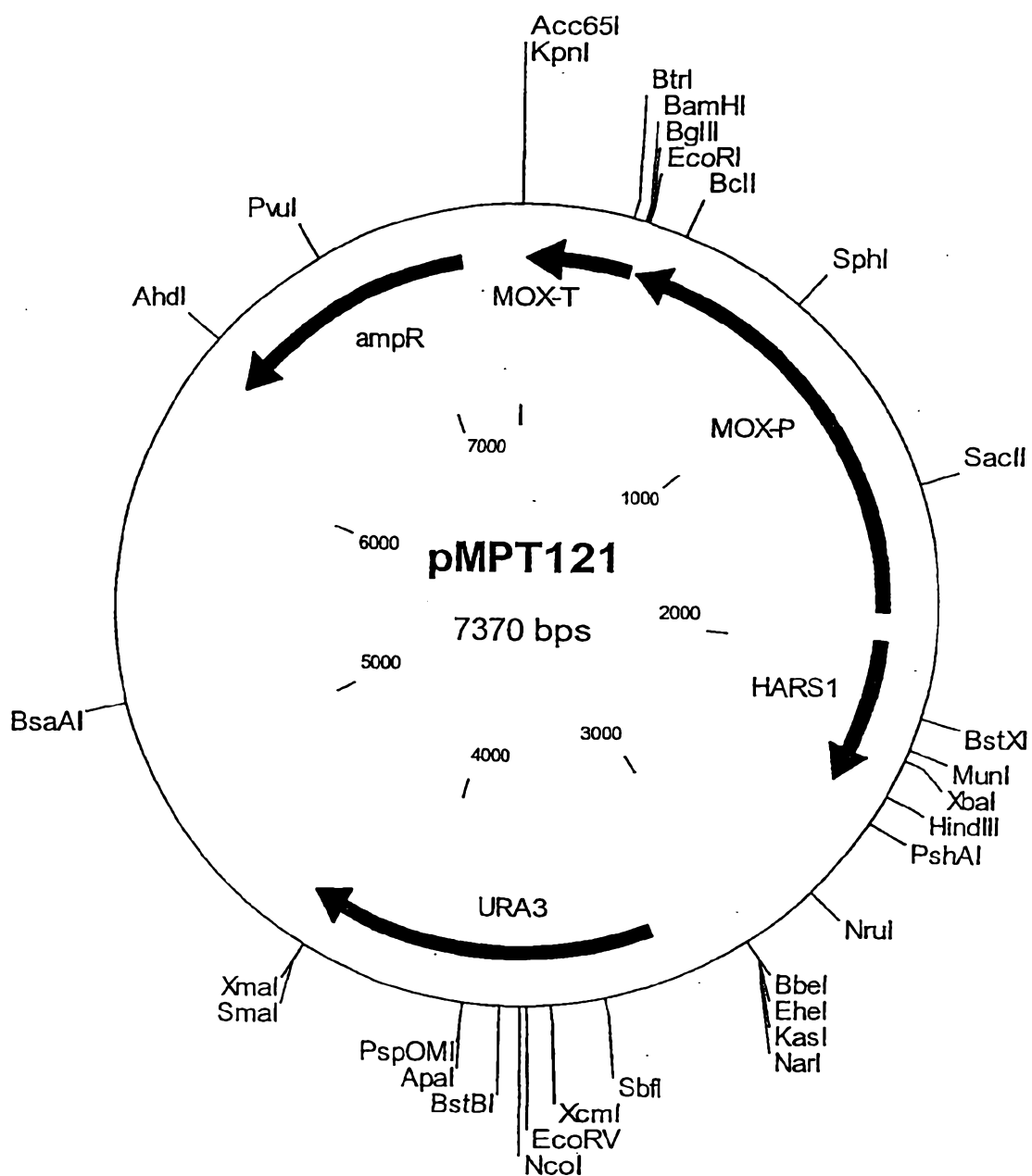
7. ábra



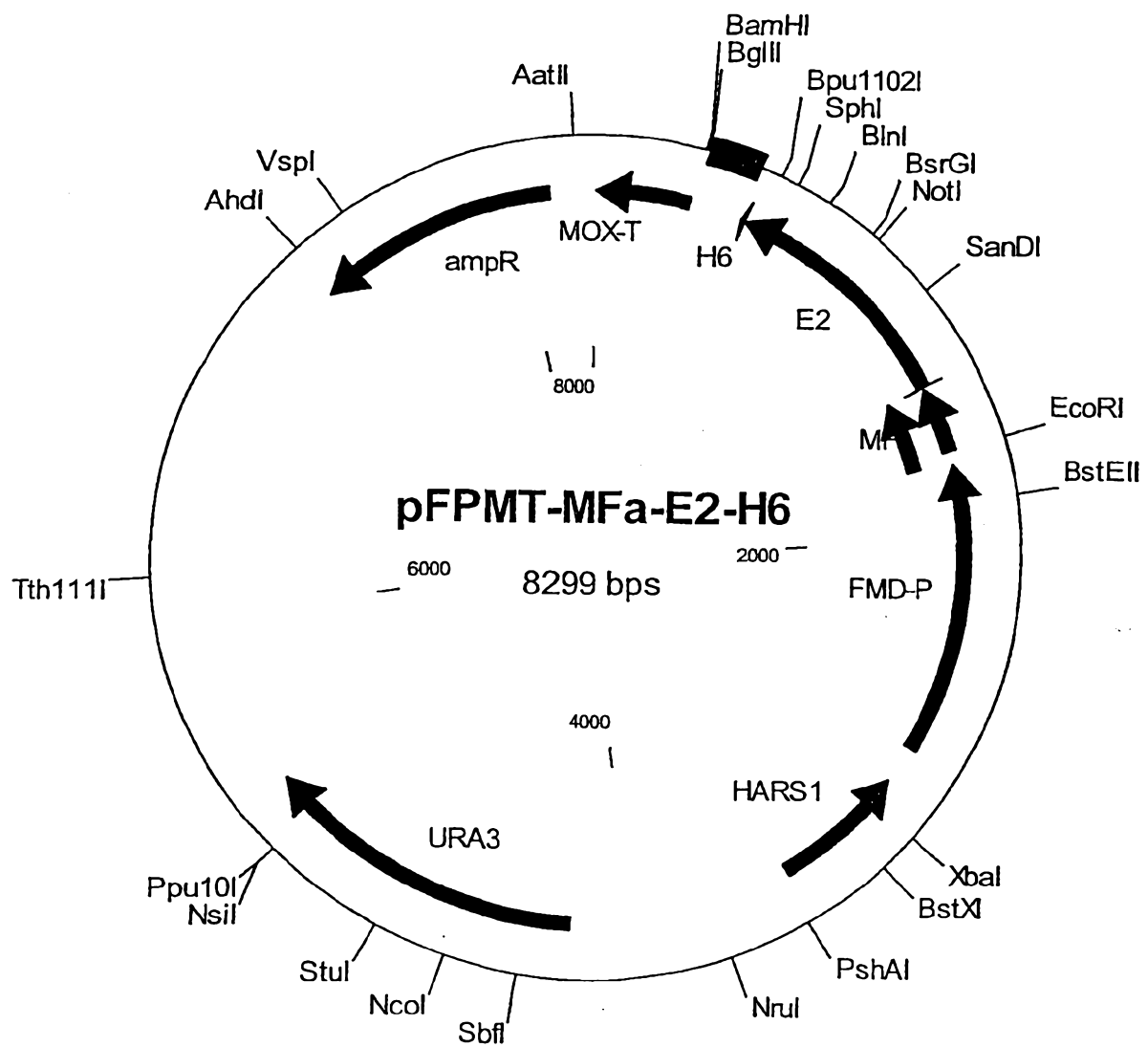
8. ábra



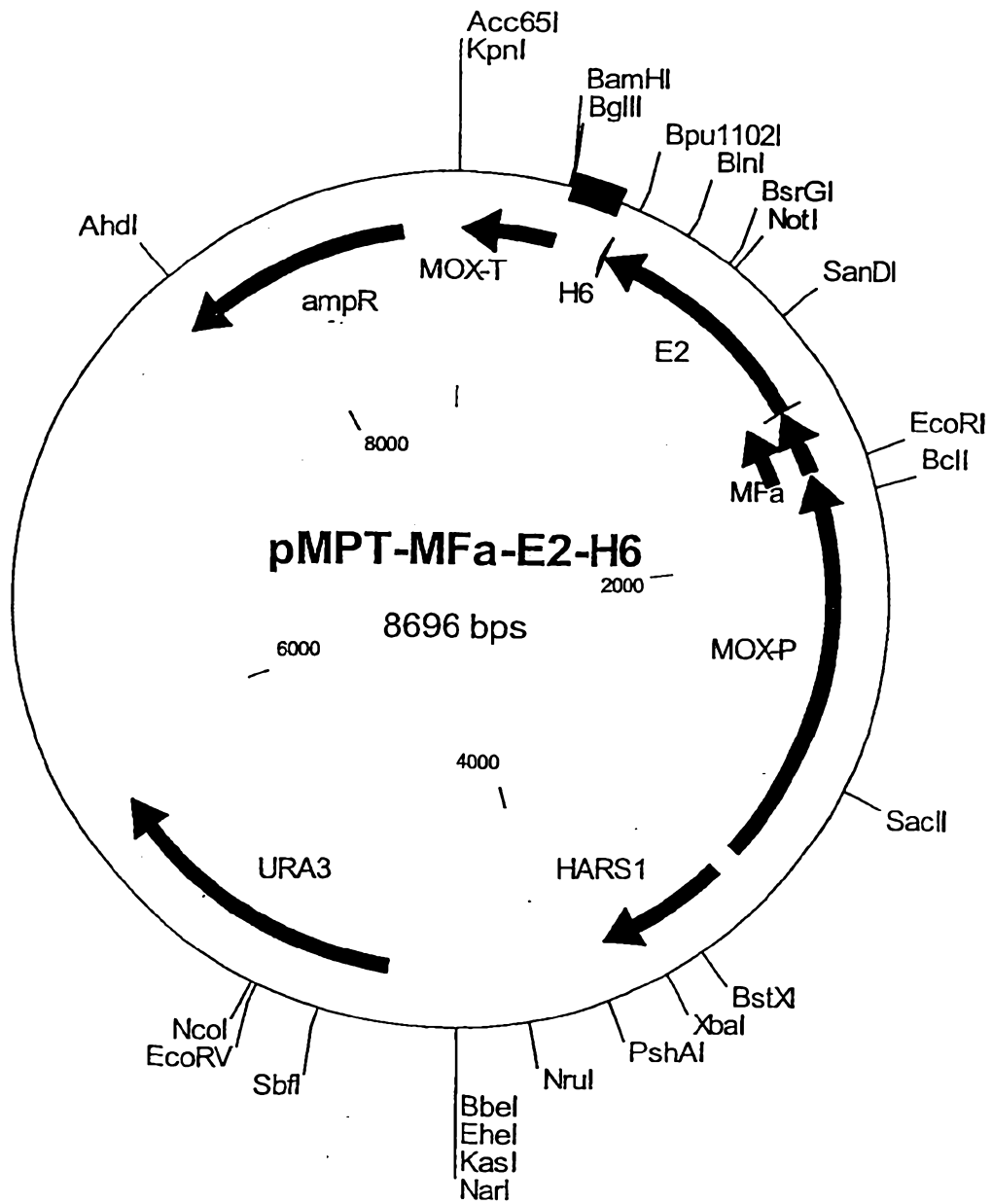
9. ábra



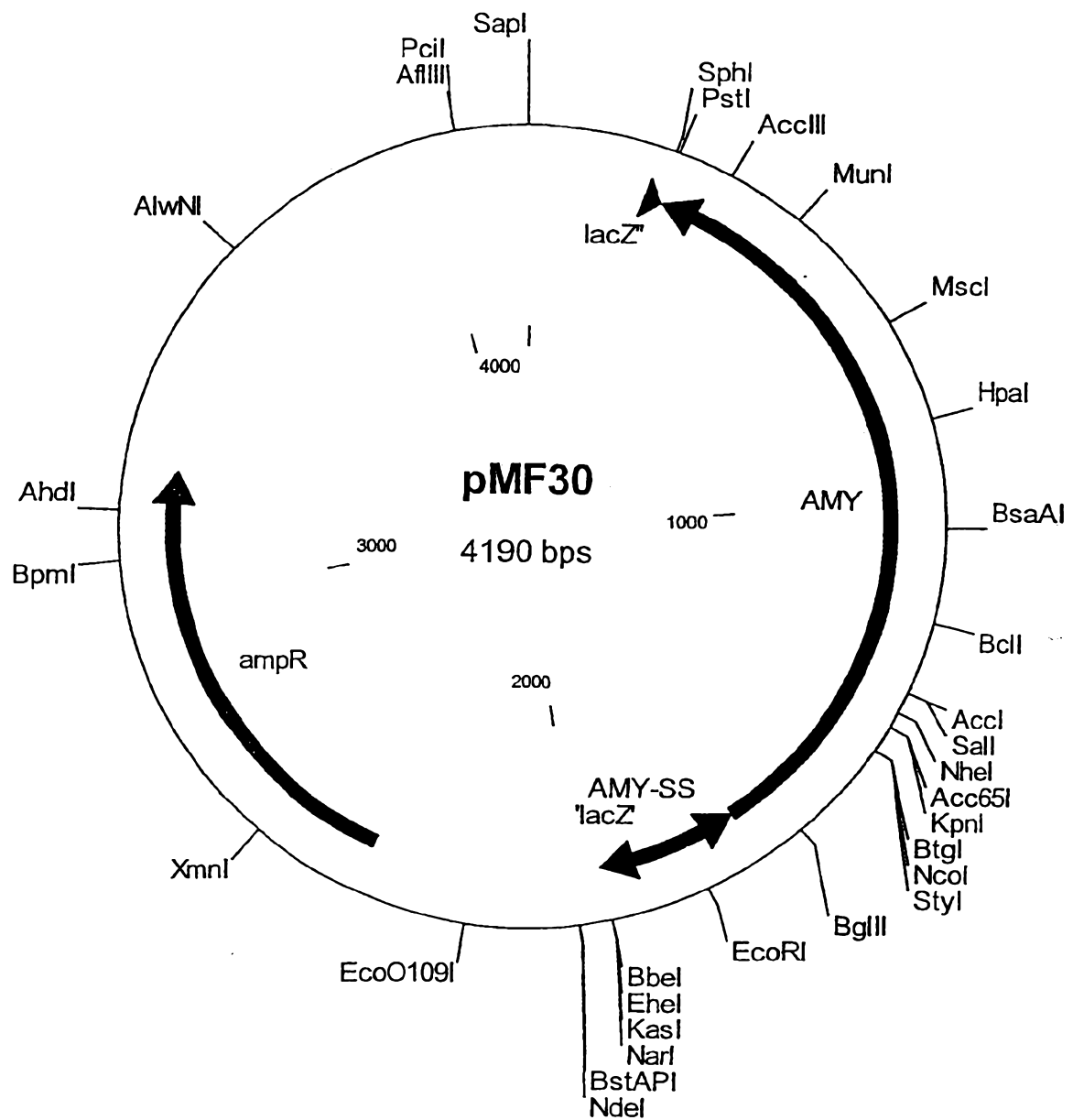
10. ábra



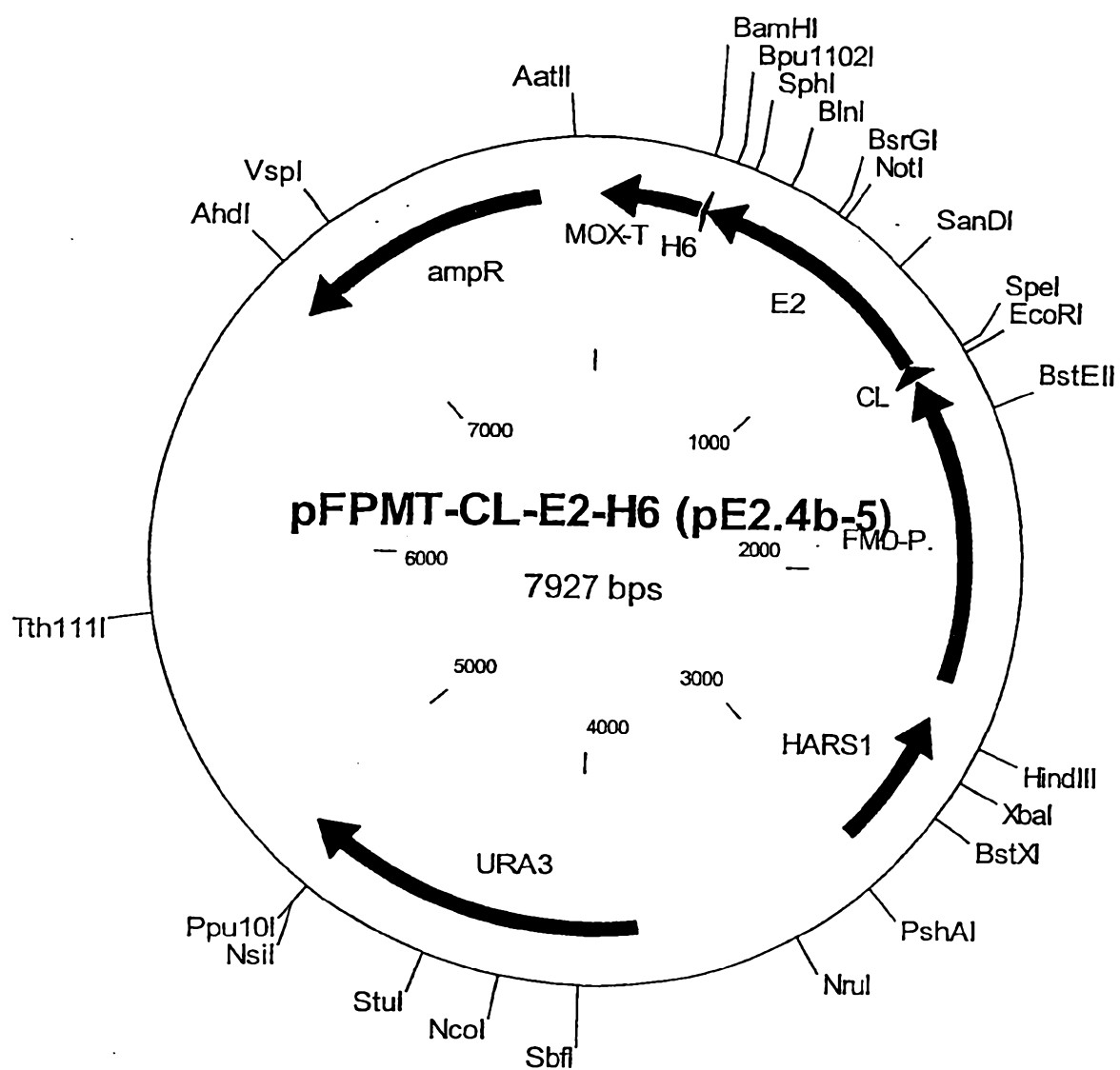
11. ábra



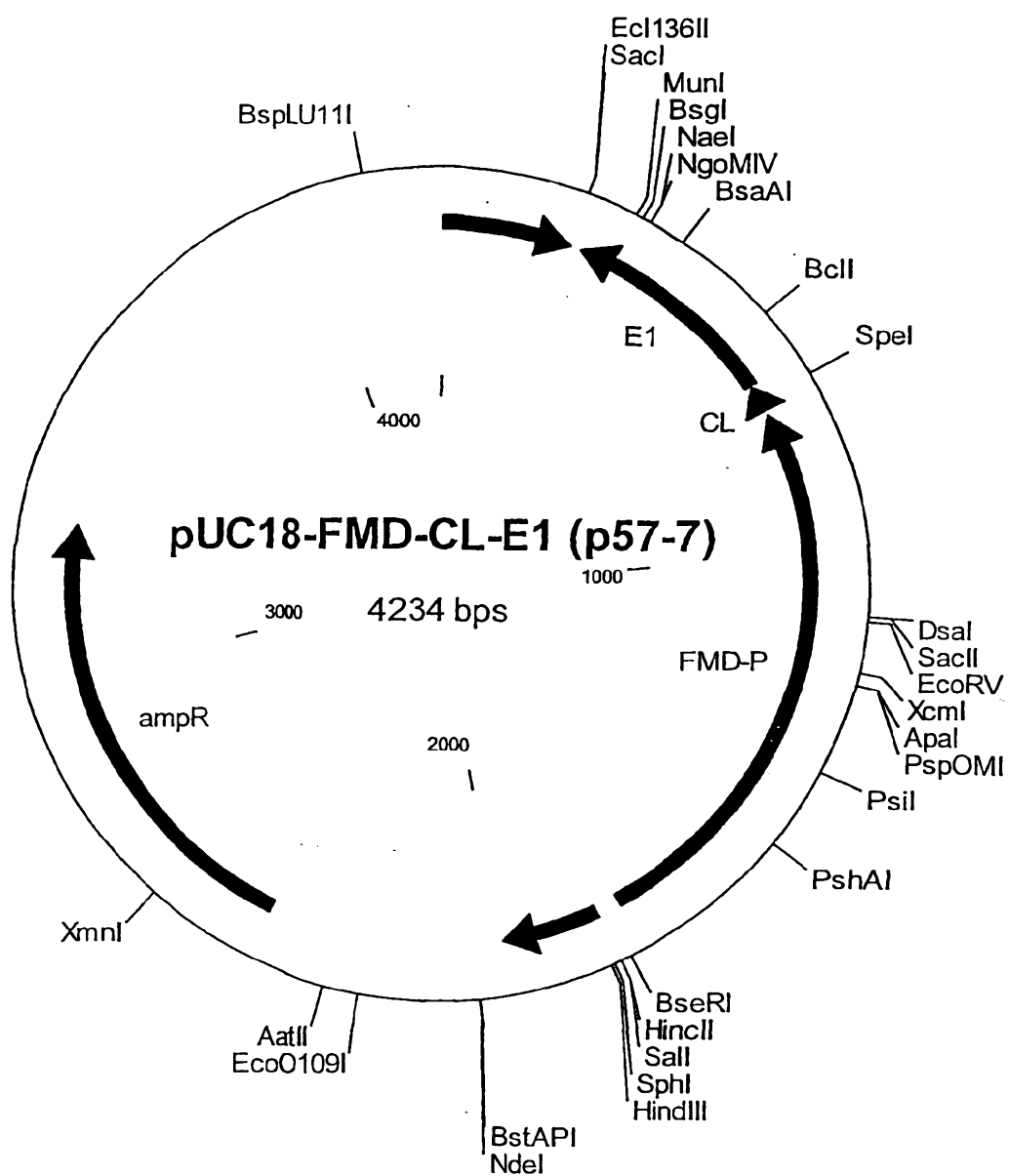
12. ábra



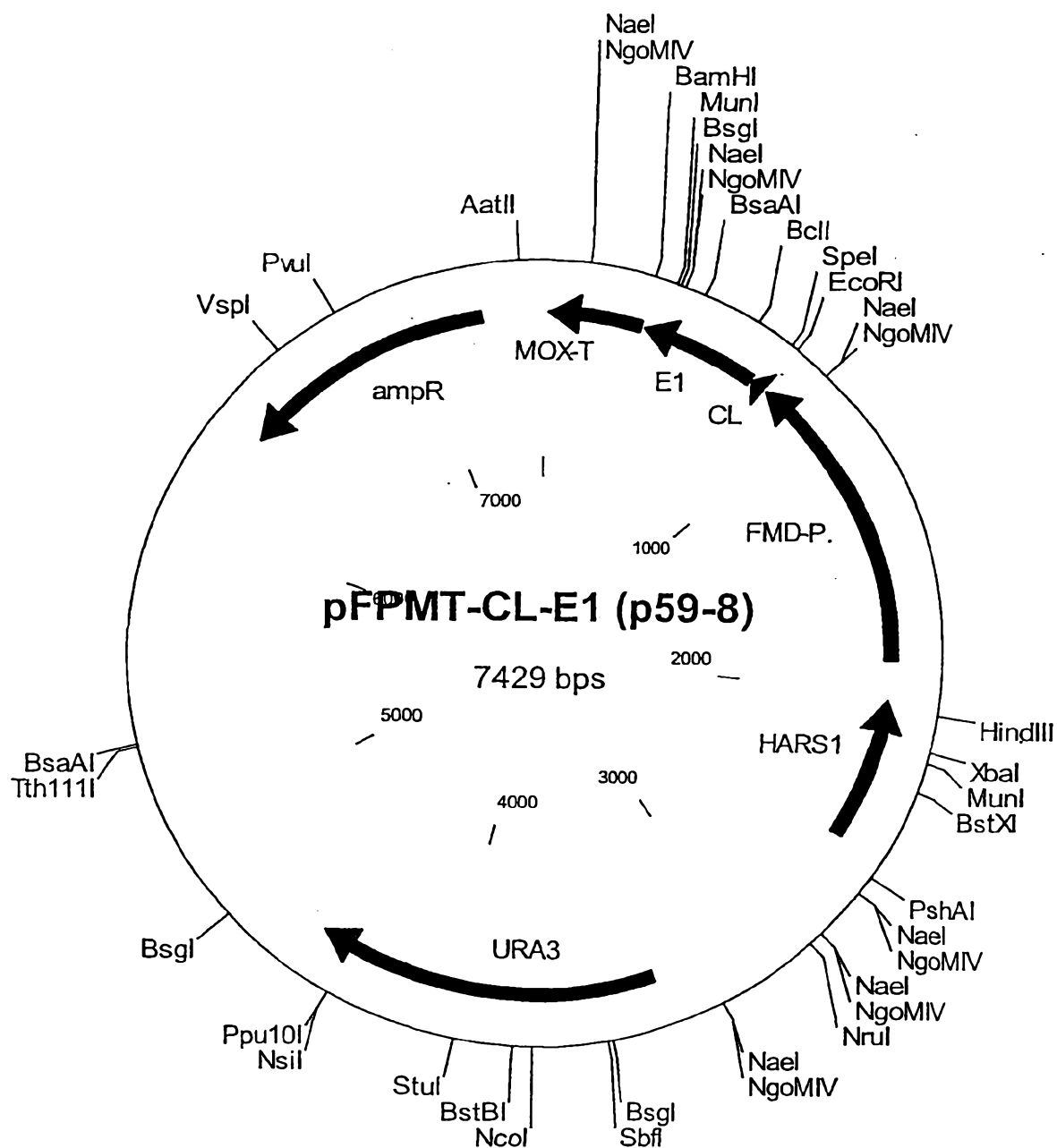
13. ábra



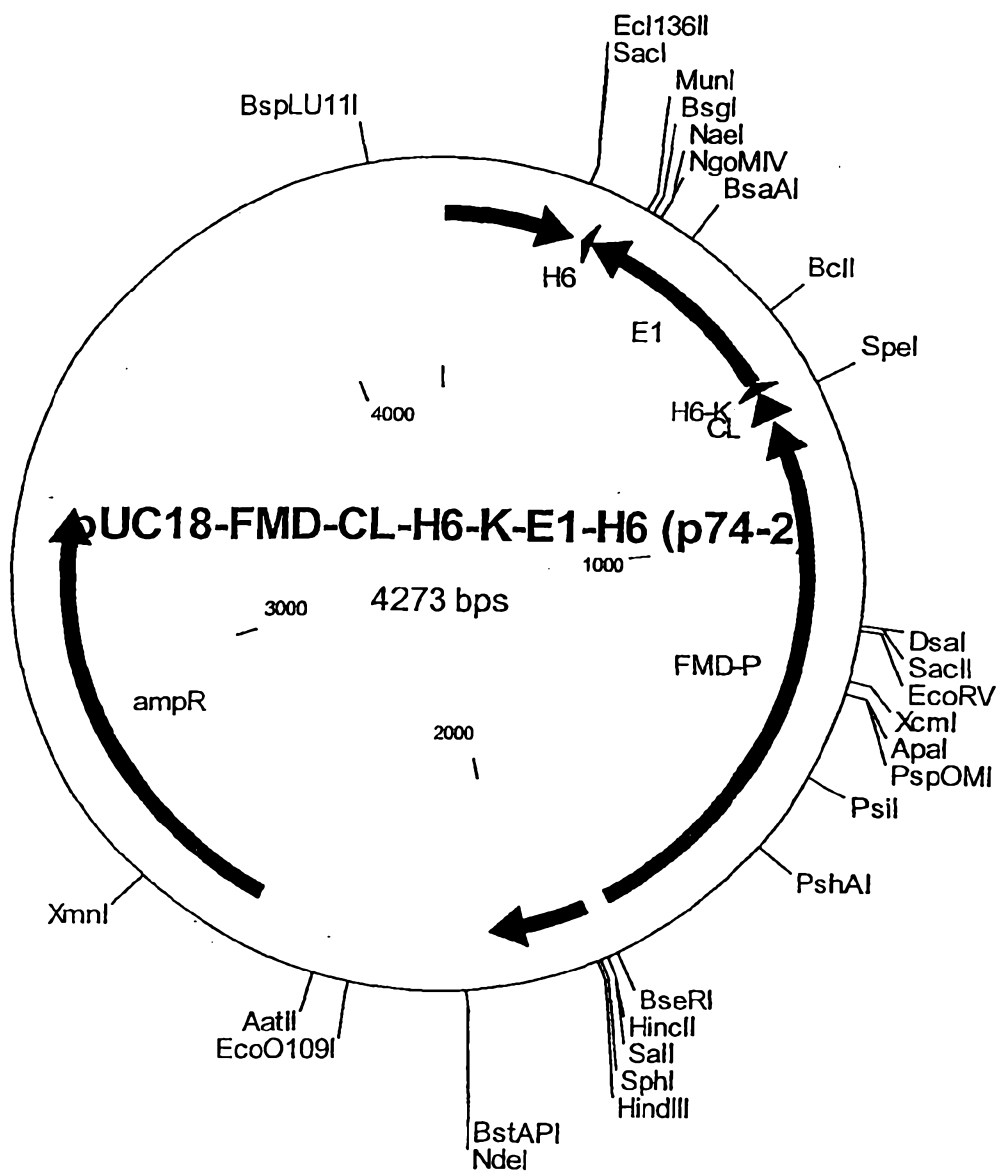
14. ábra



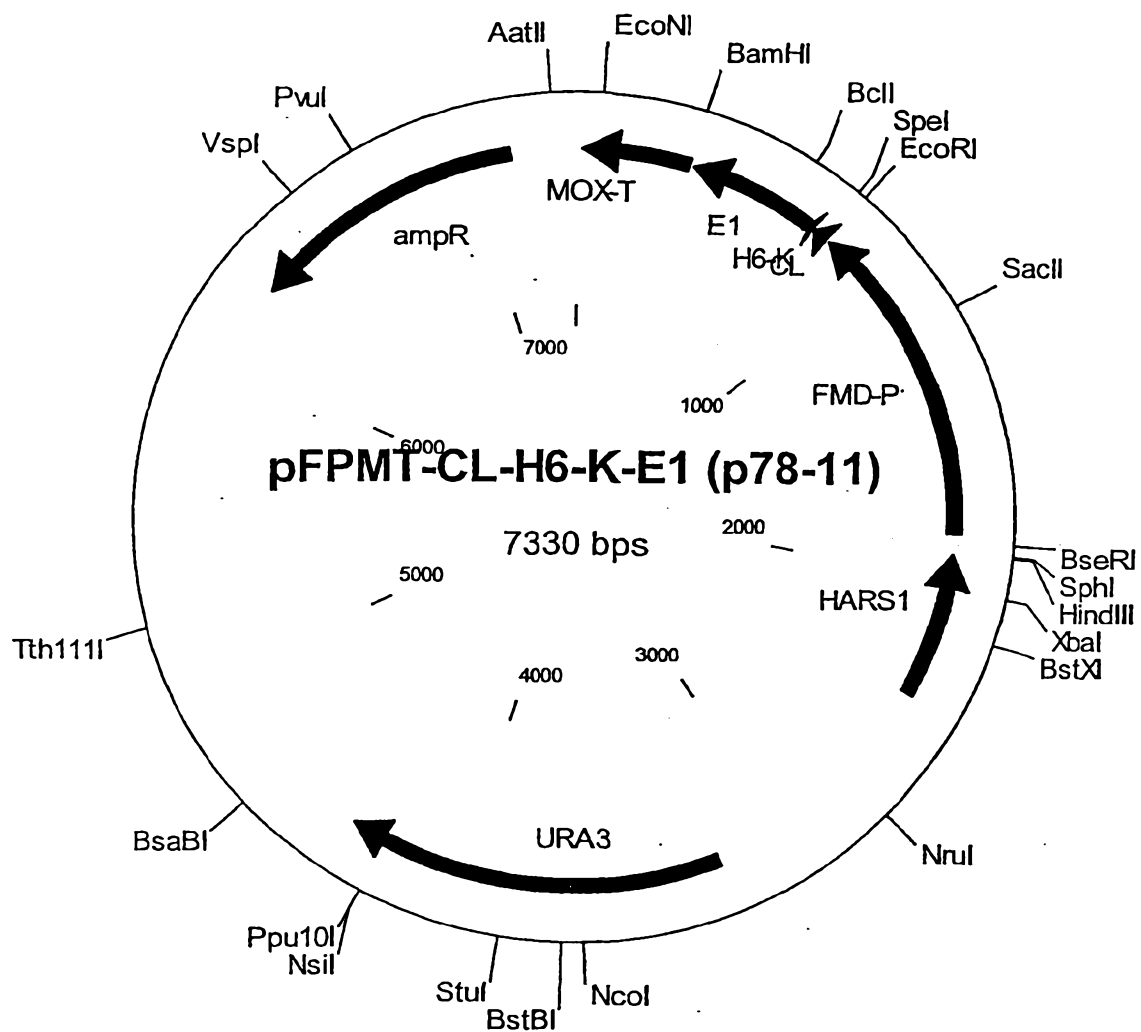
15. ábra



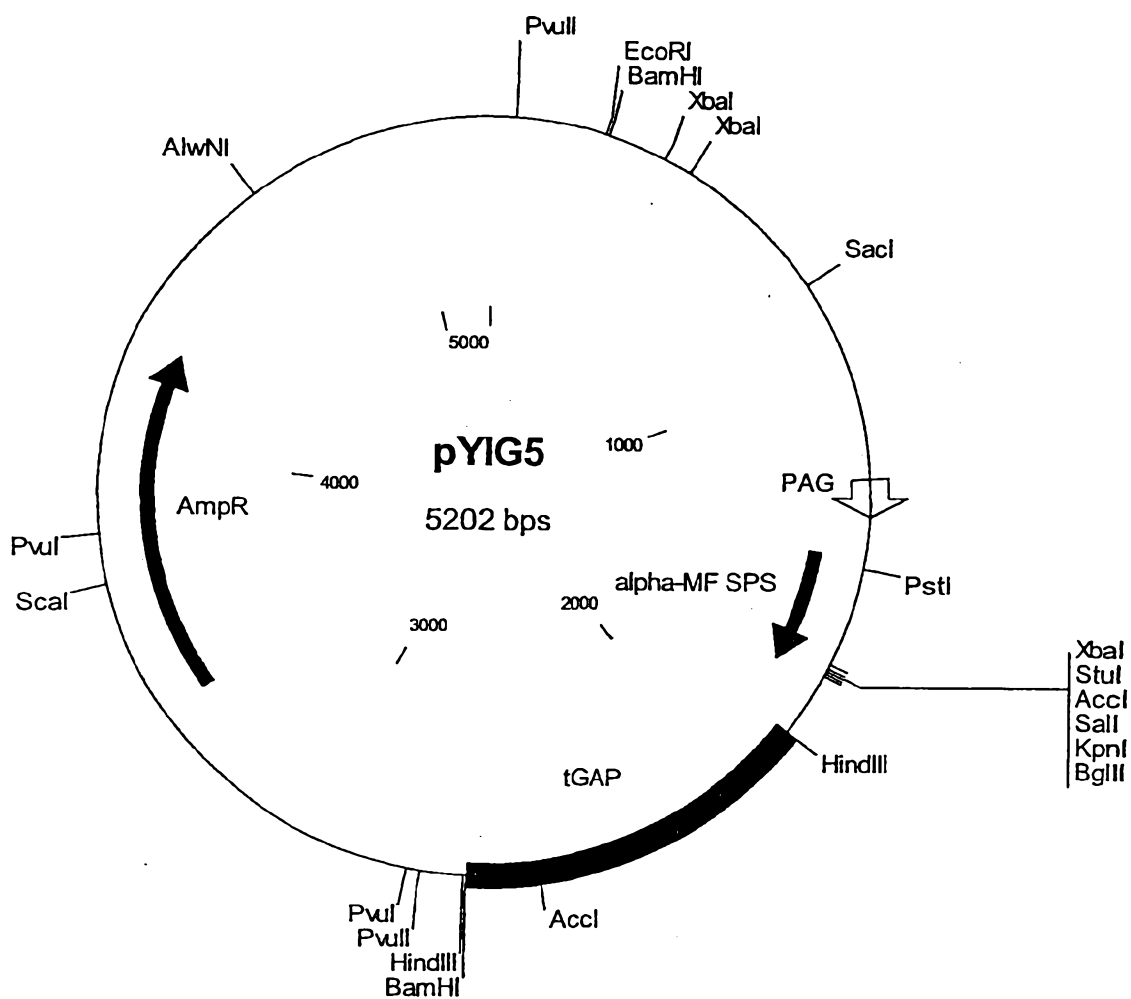
16. ábra



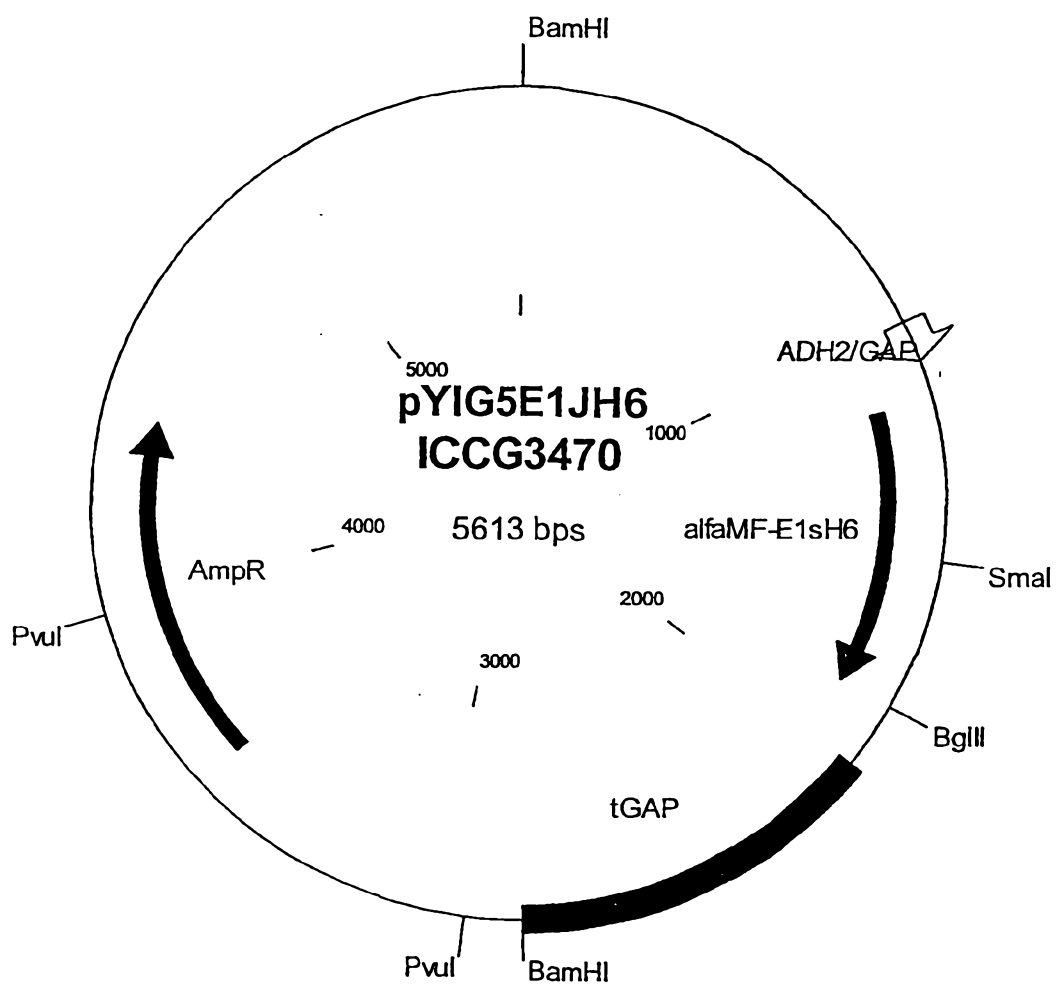
17. ábra



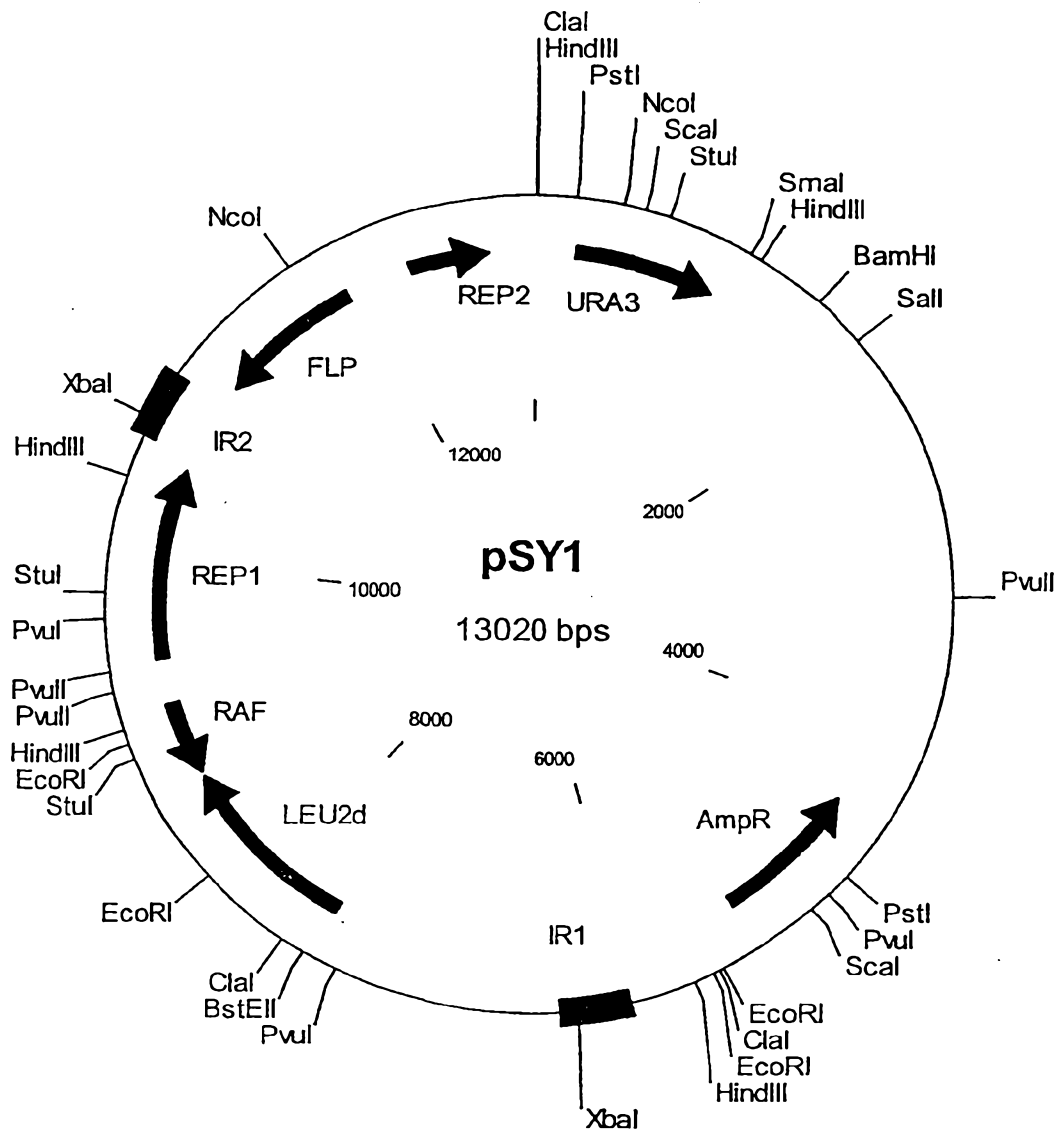
18. ábra



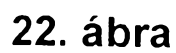
19. ábra

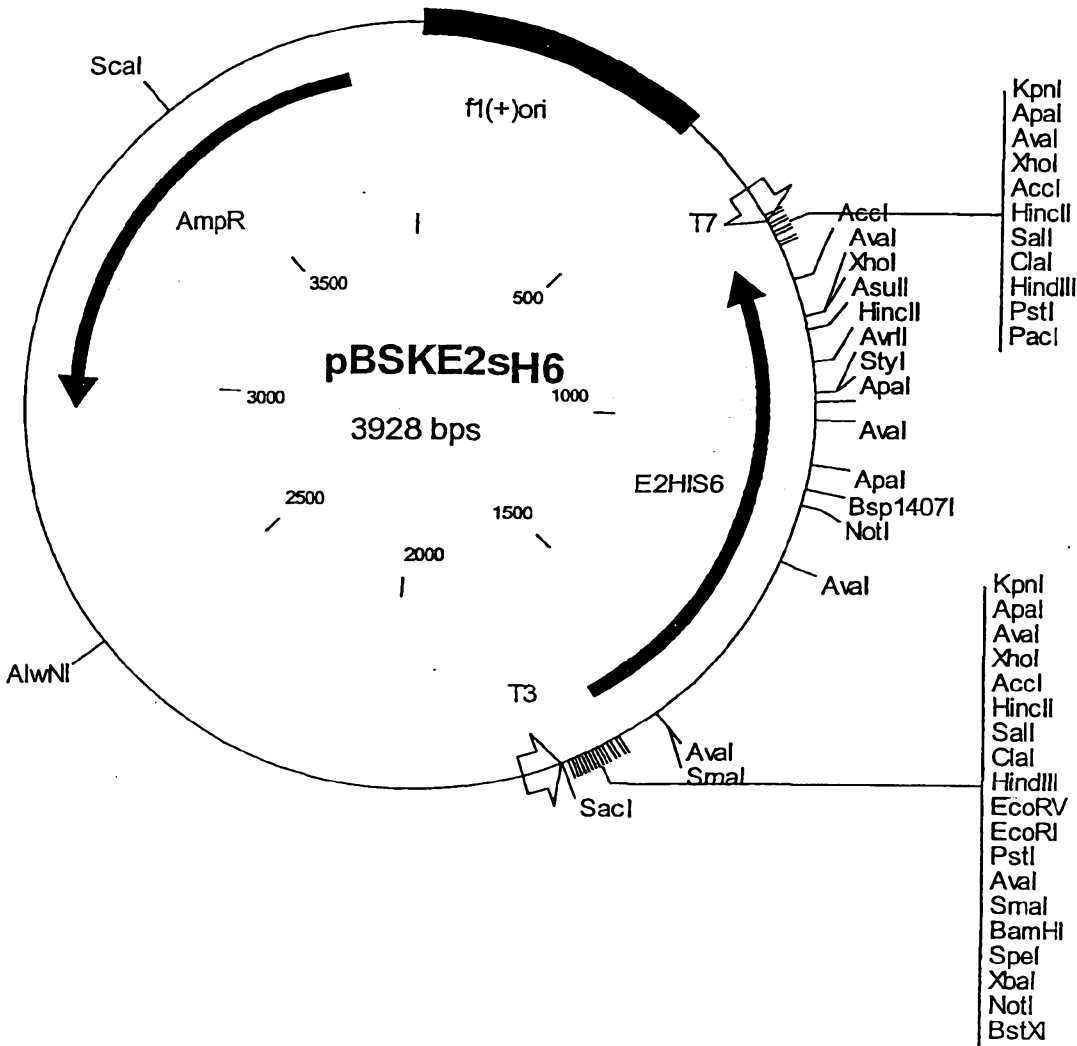


20. ábra

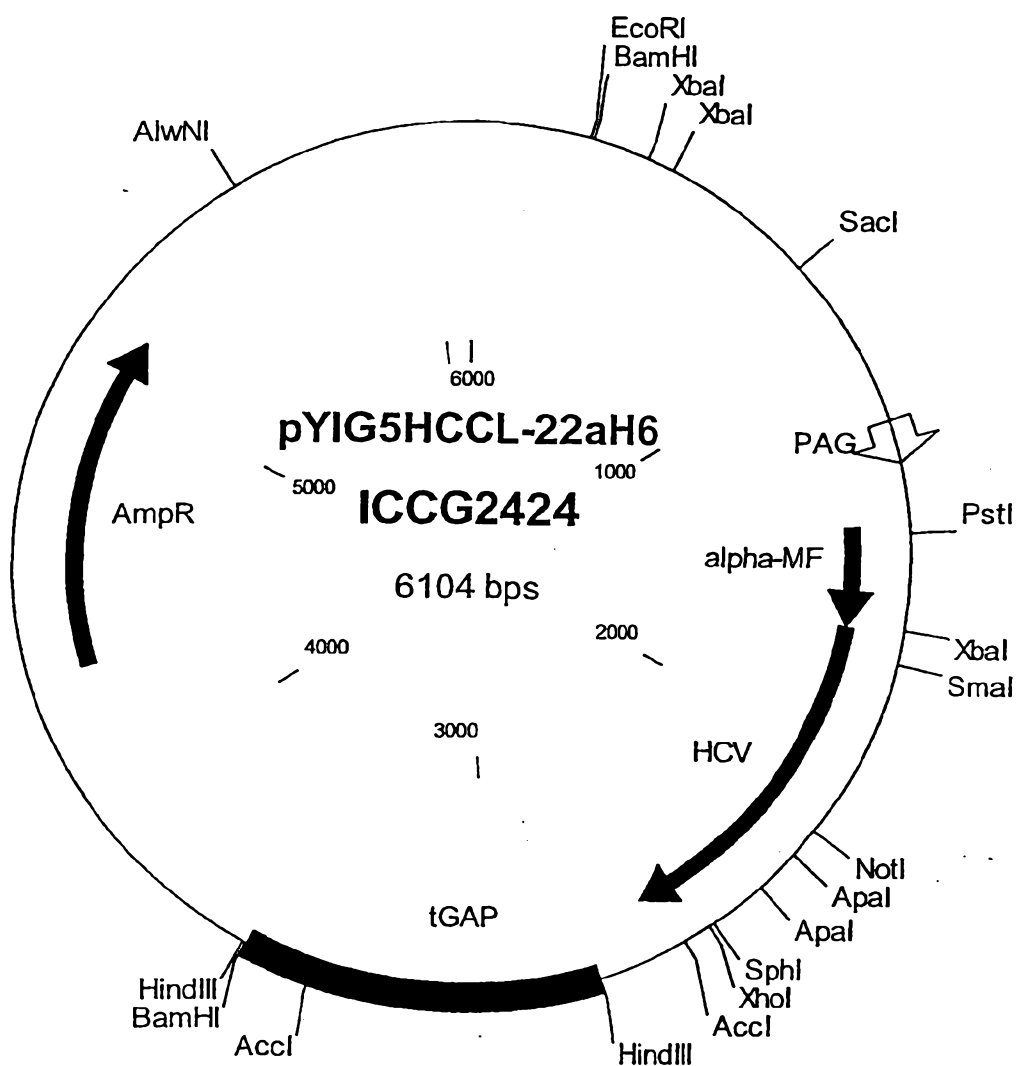


21. ábra

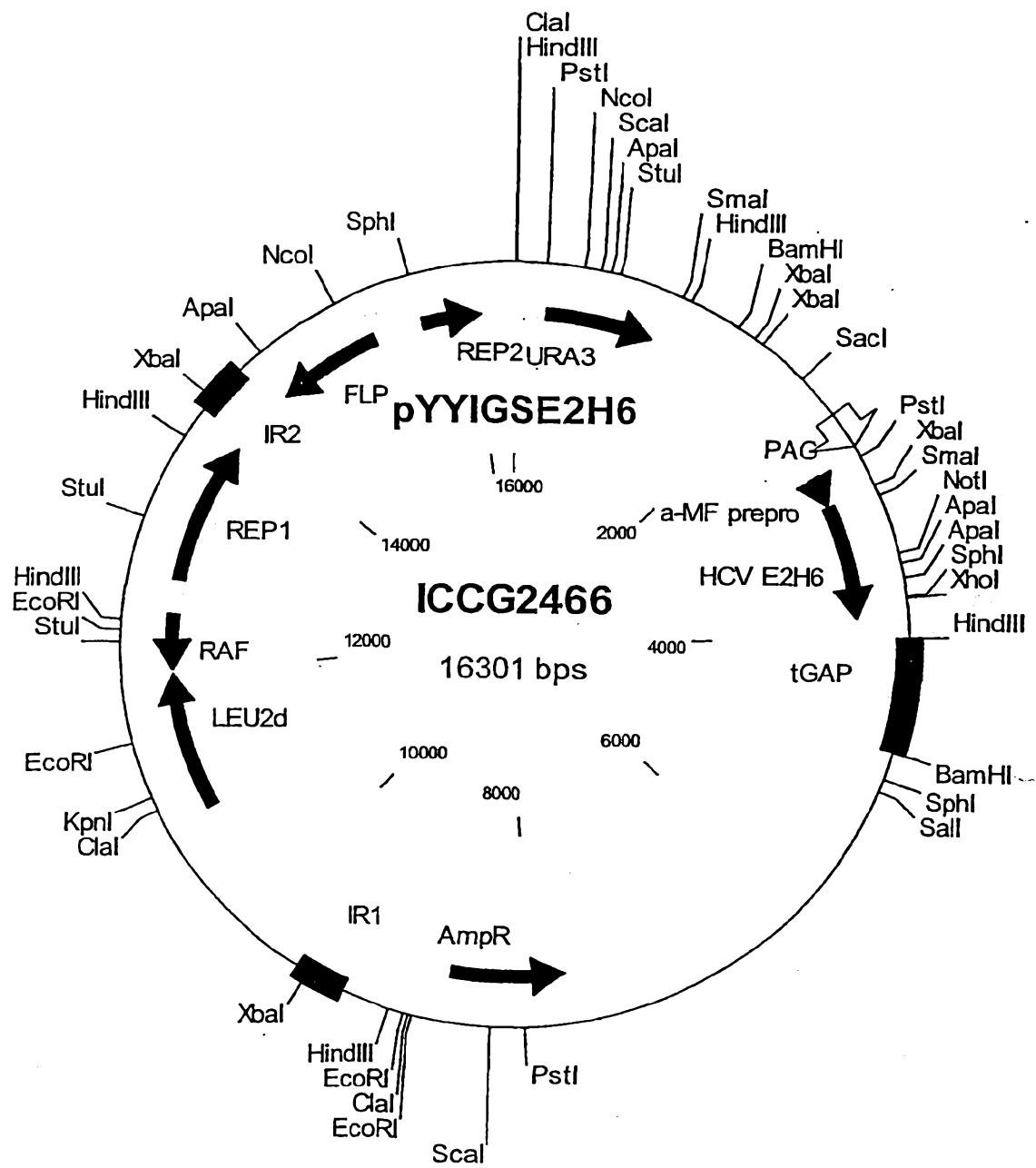




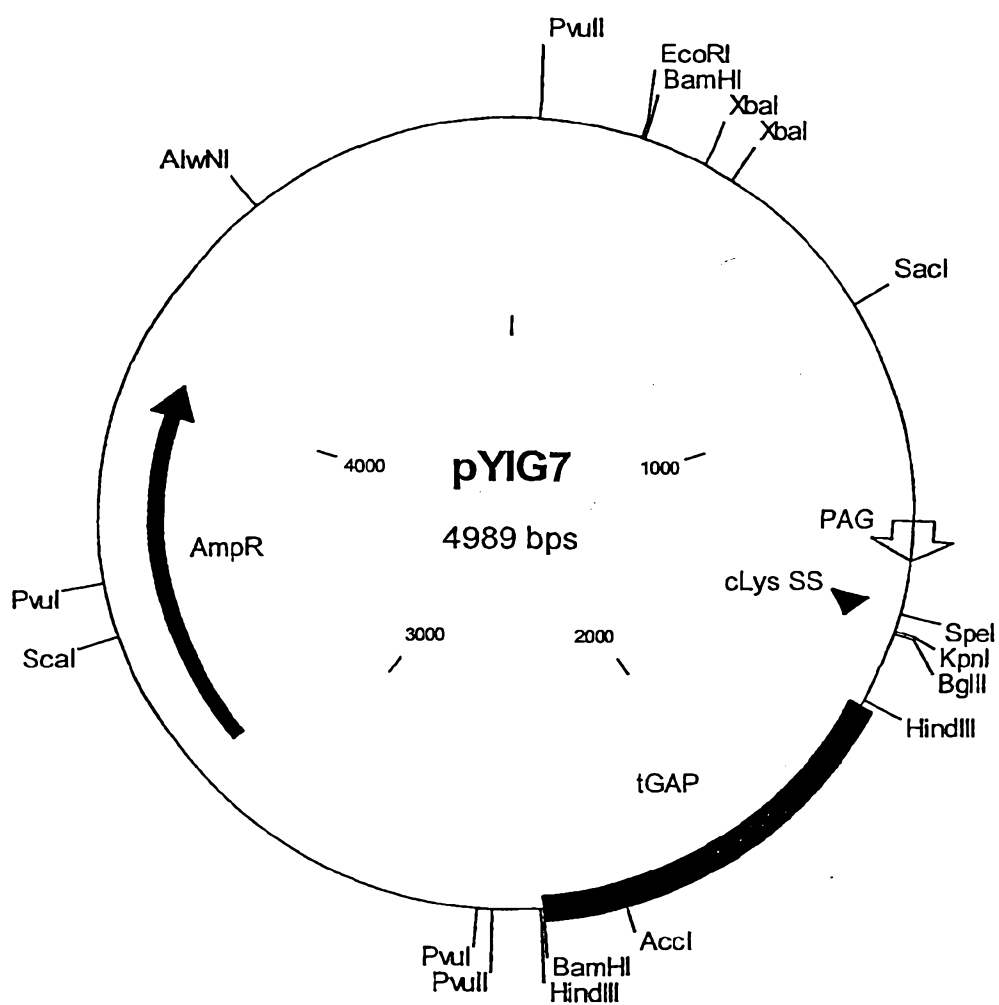
23. ábra



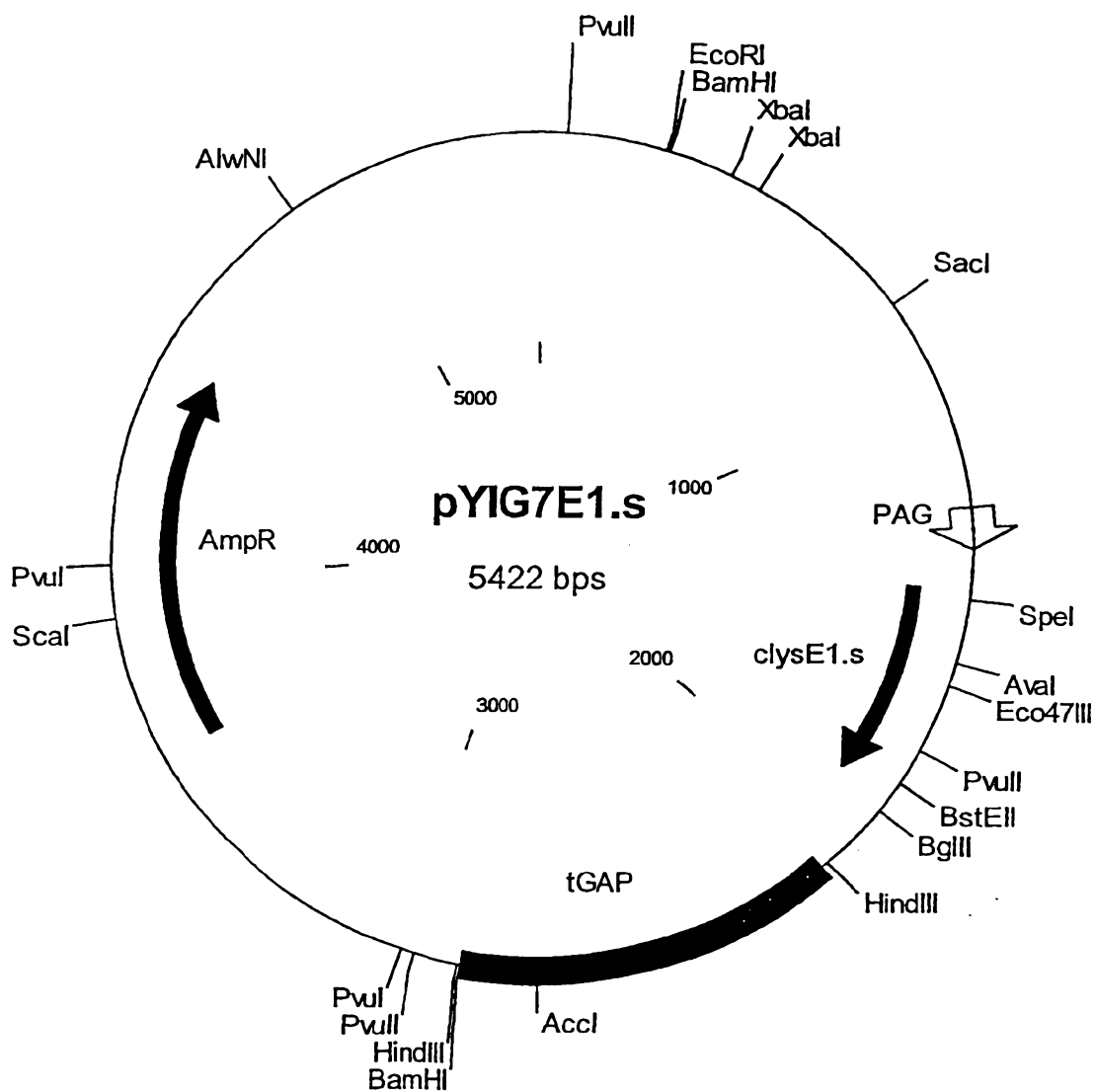
24. ábra



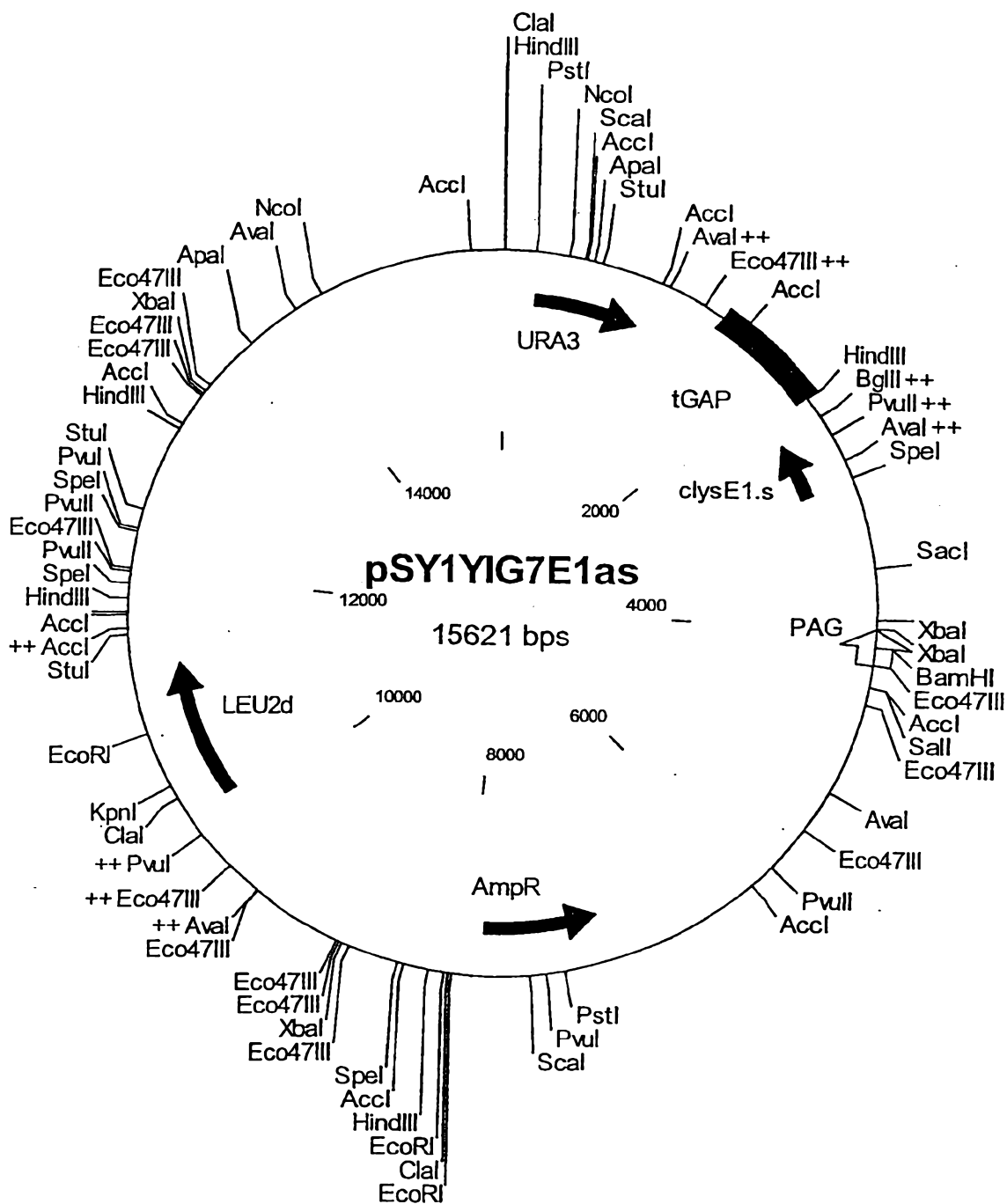
25. ábra



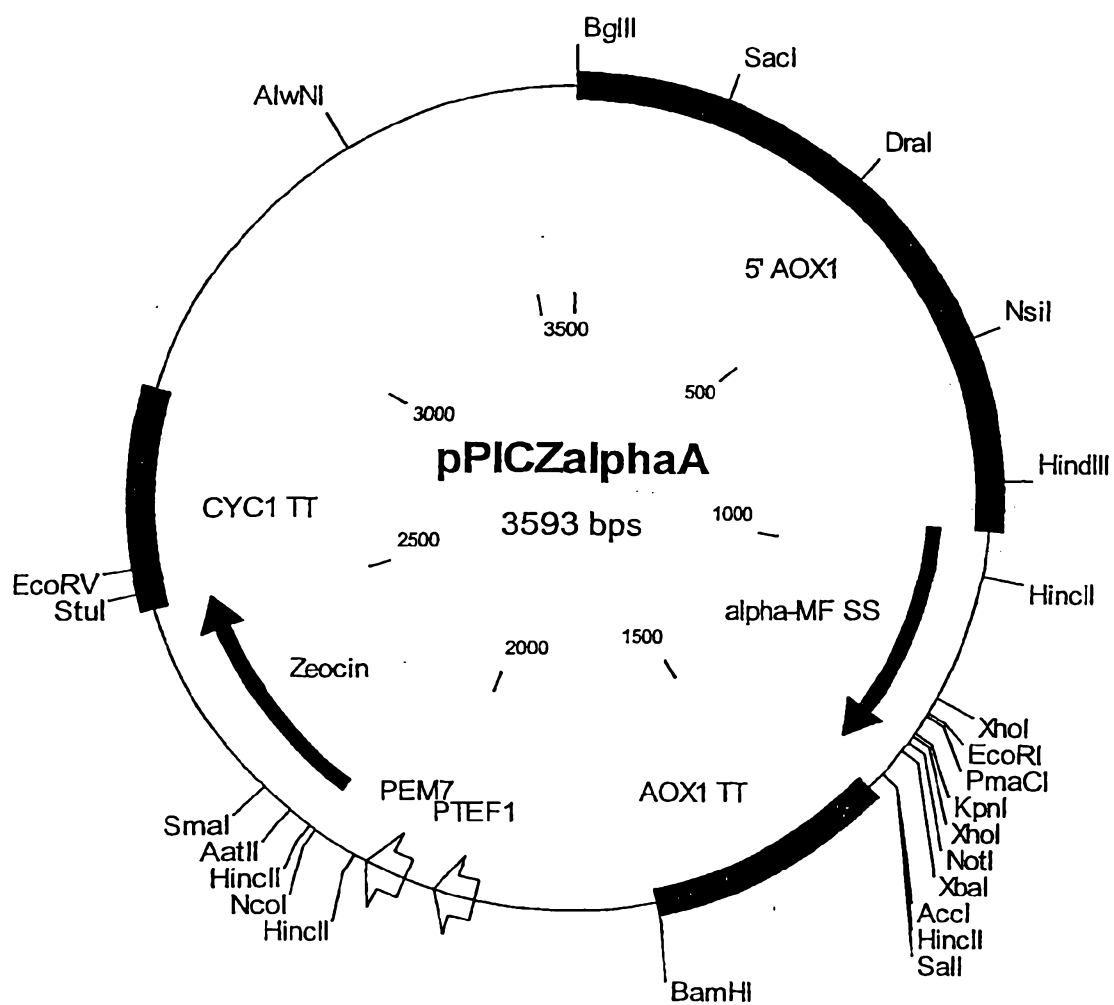
26. ábra



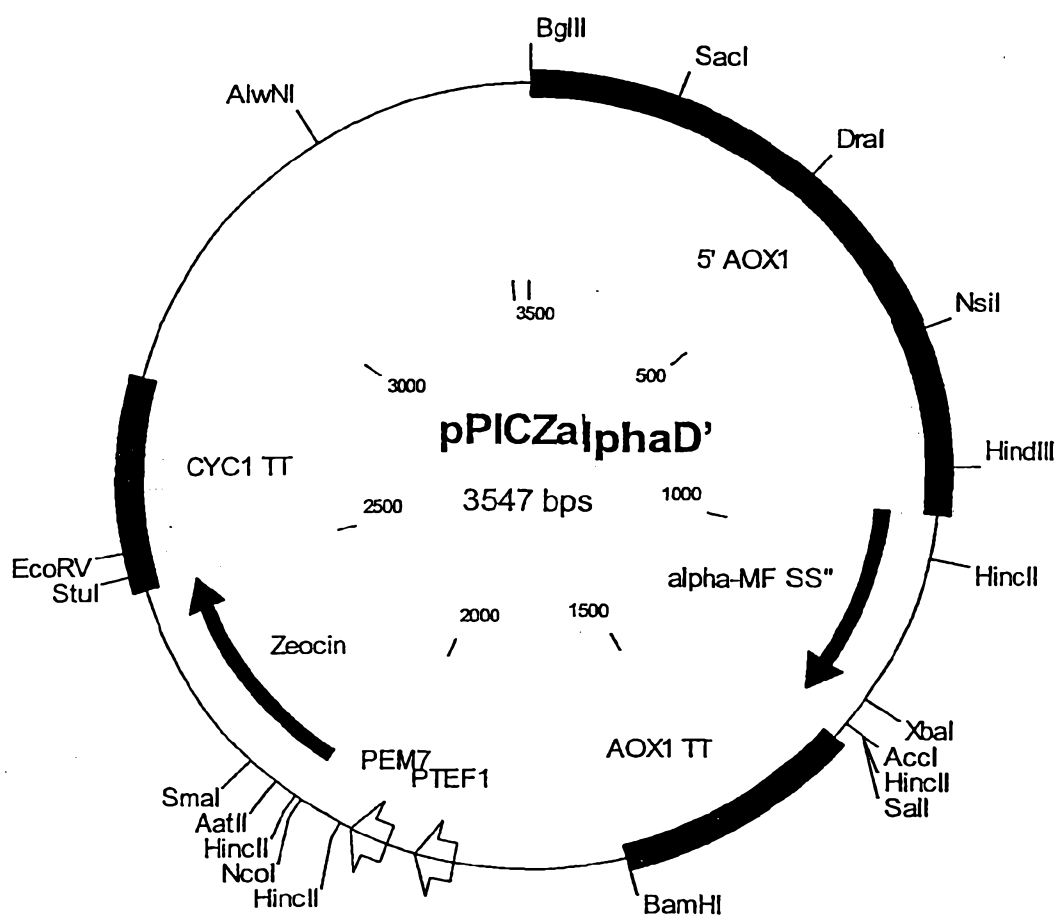
27. ábra



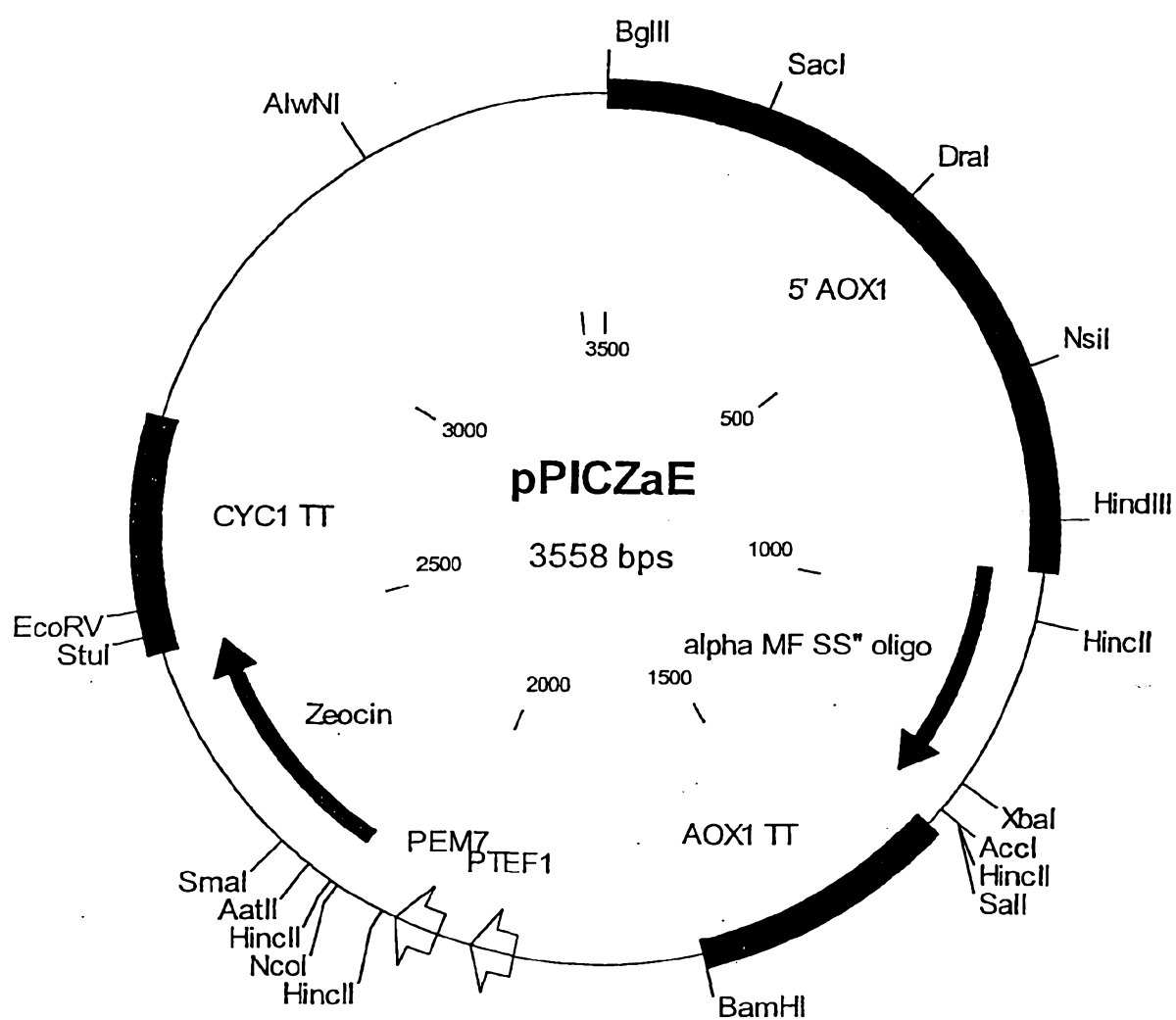
## 28. ábra



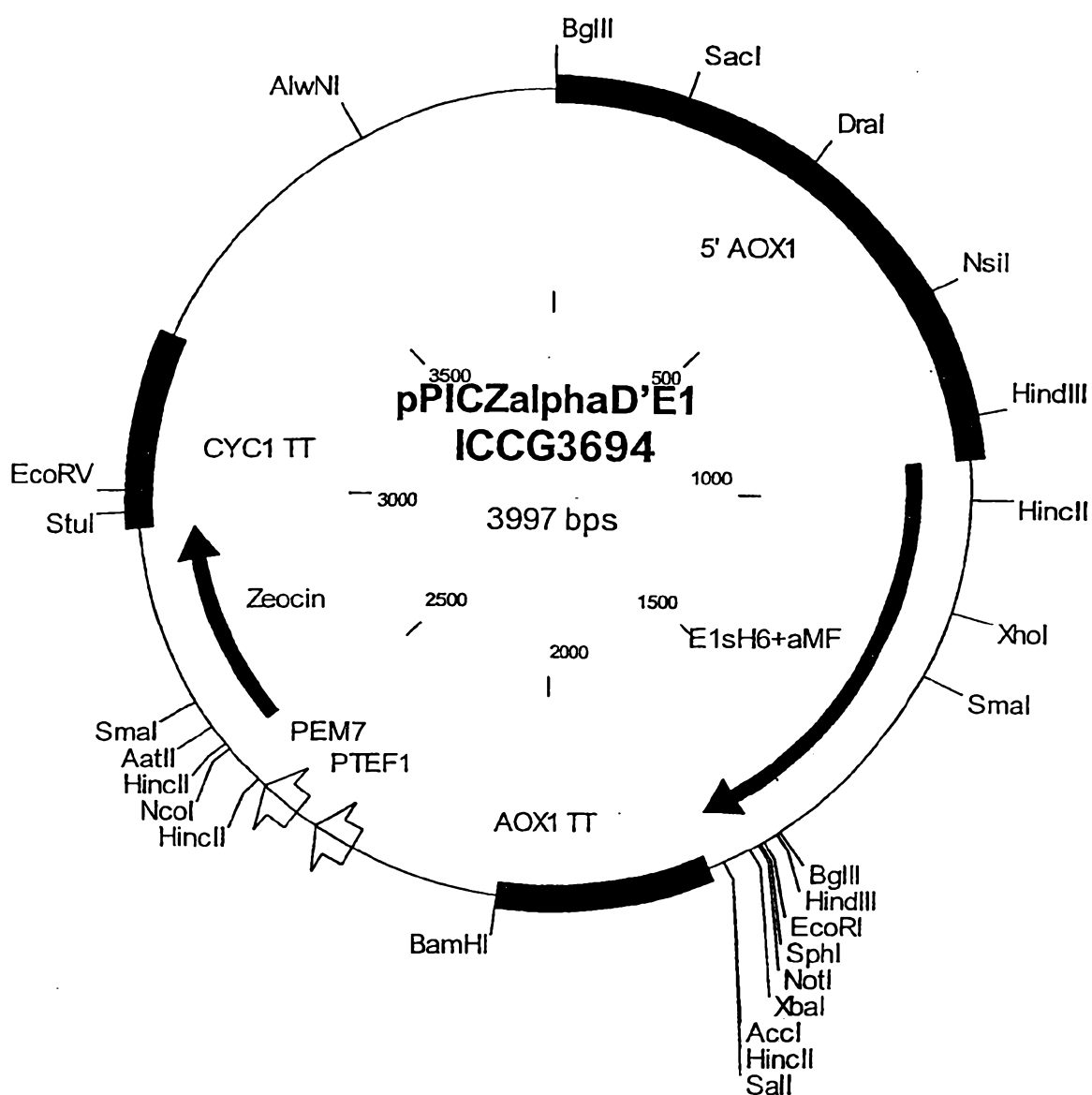
29. ábra



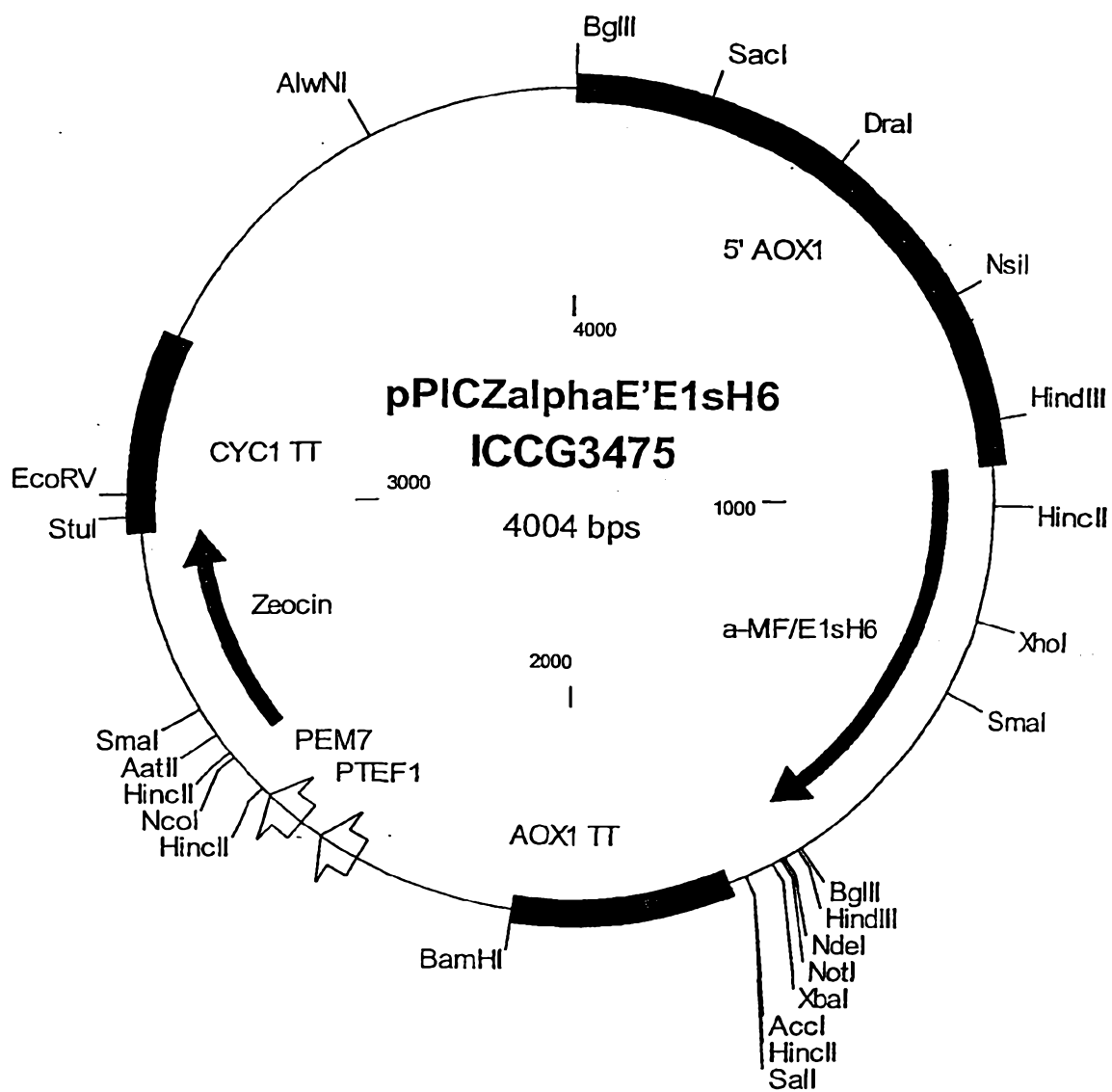
30. ábra



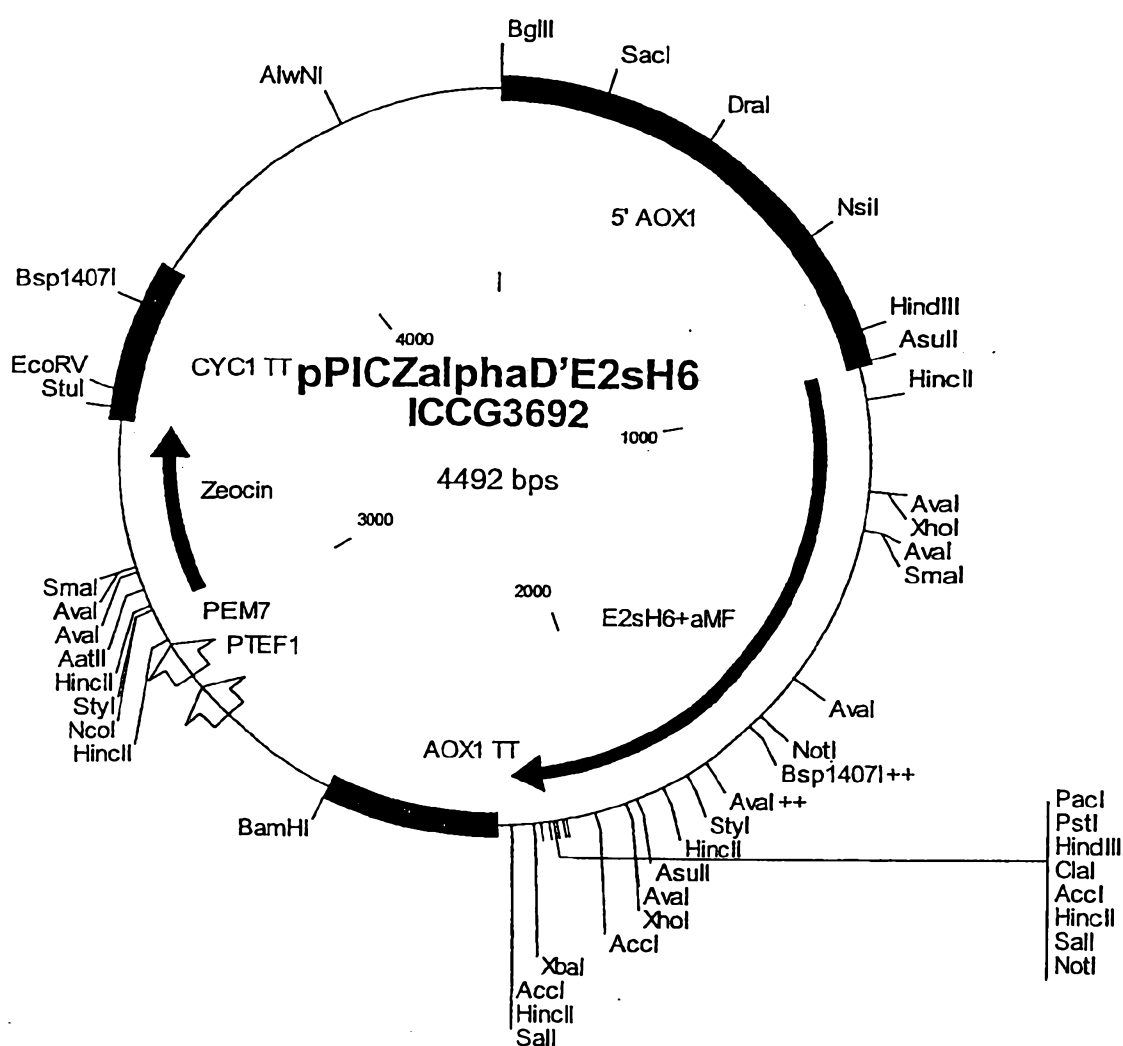
31. ábra



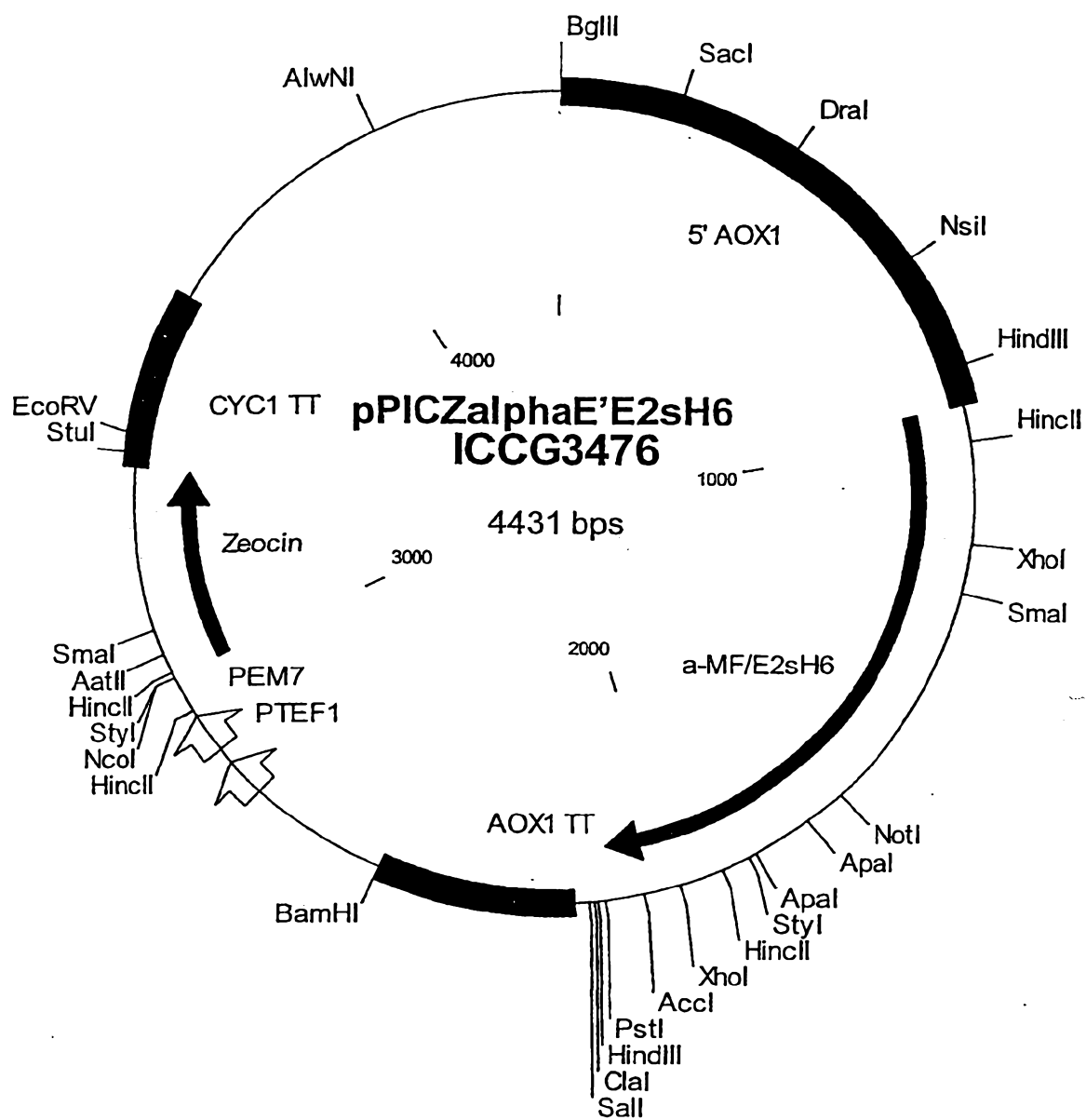
32. ábra



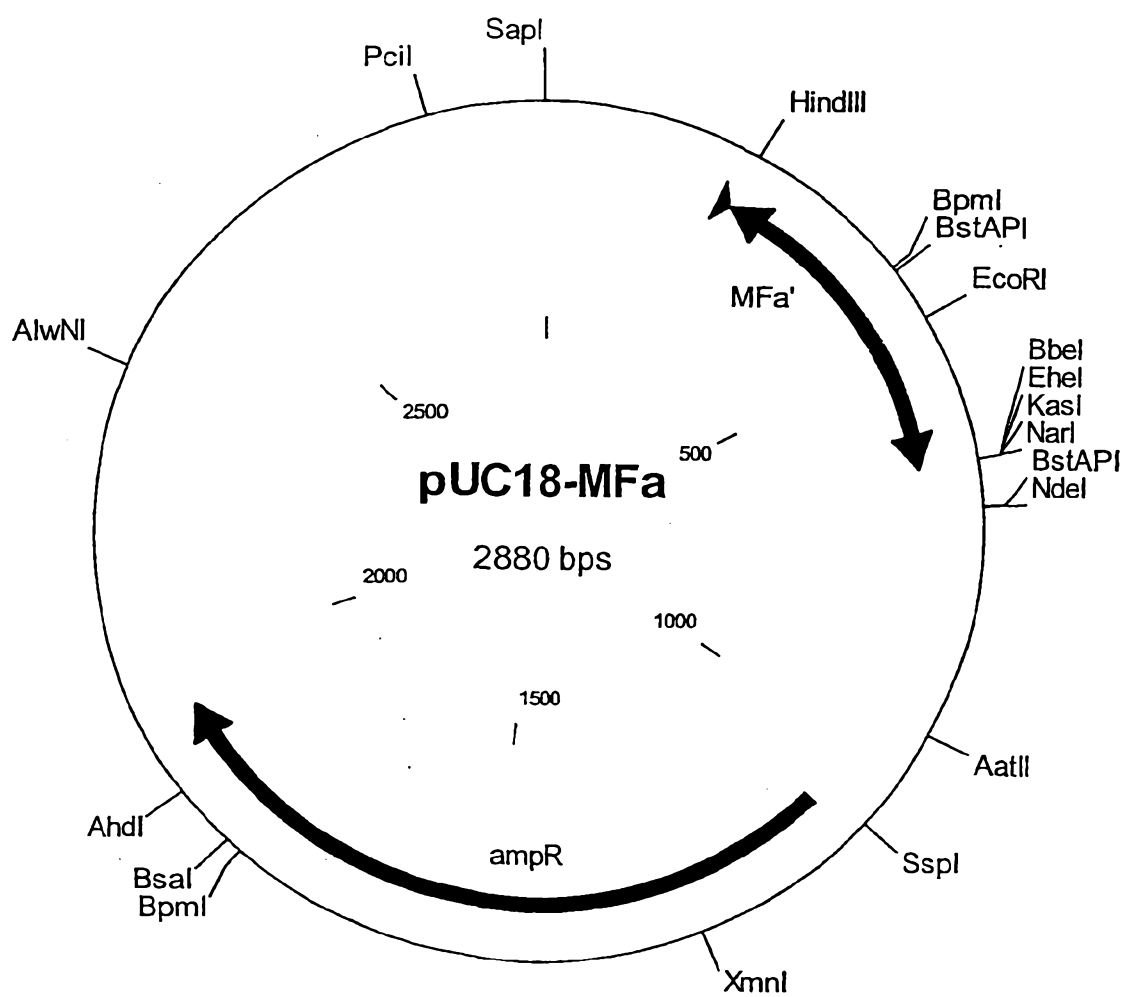
33. ábra



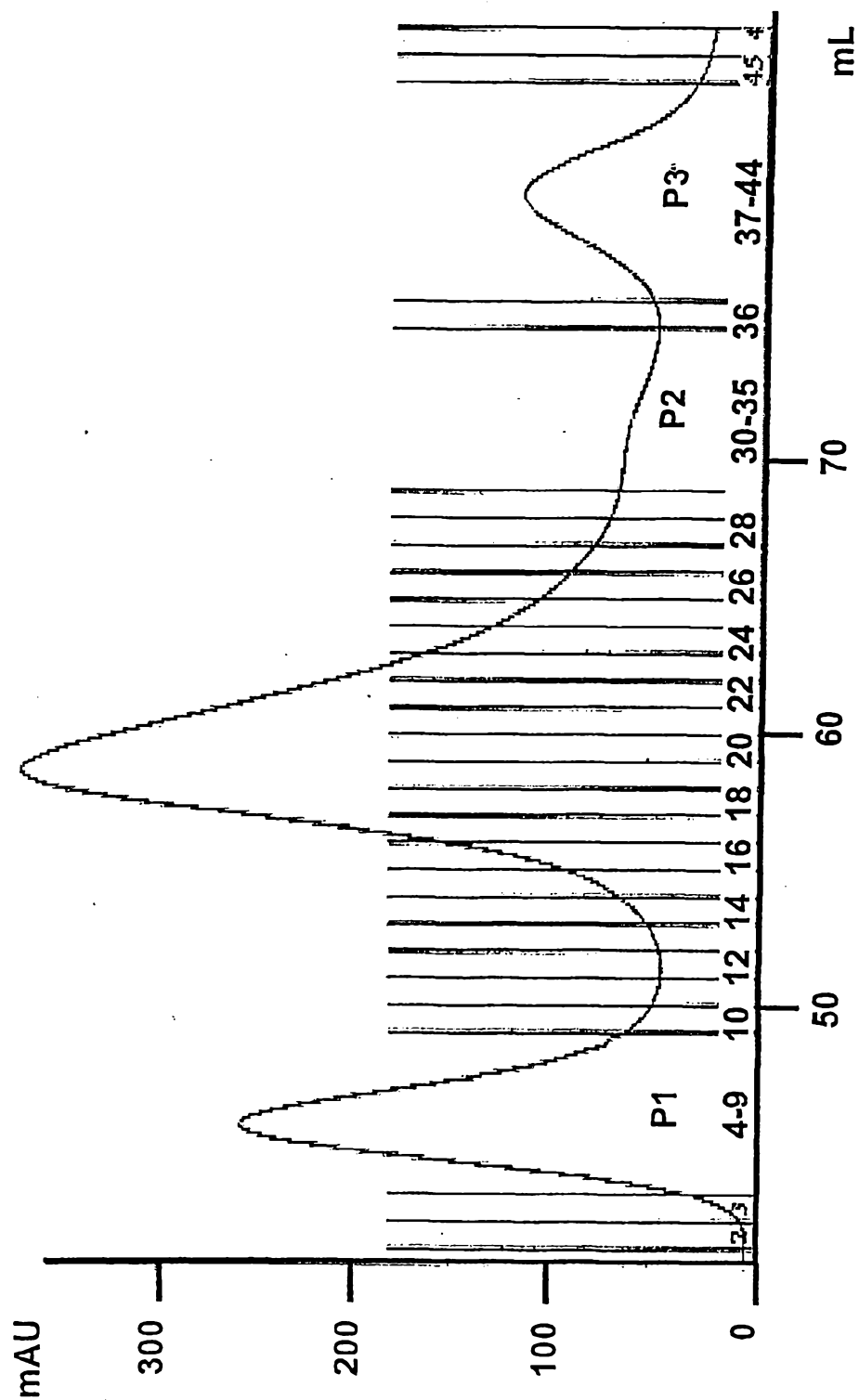
34. ábra



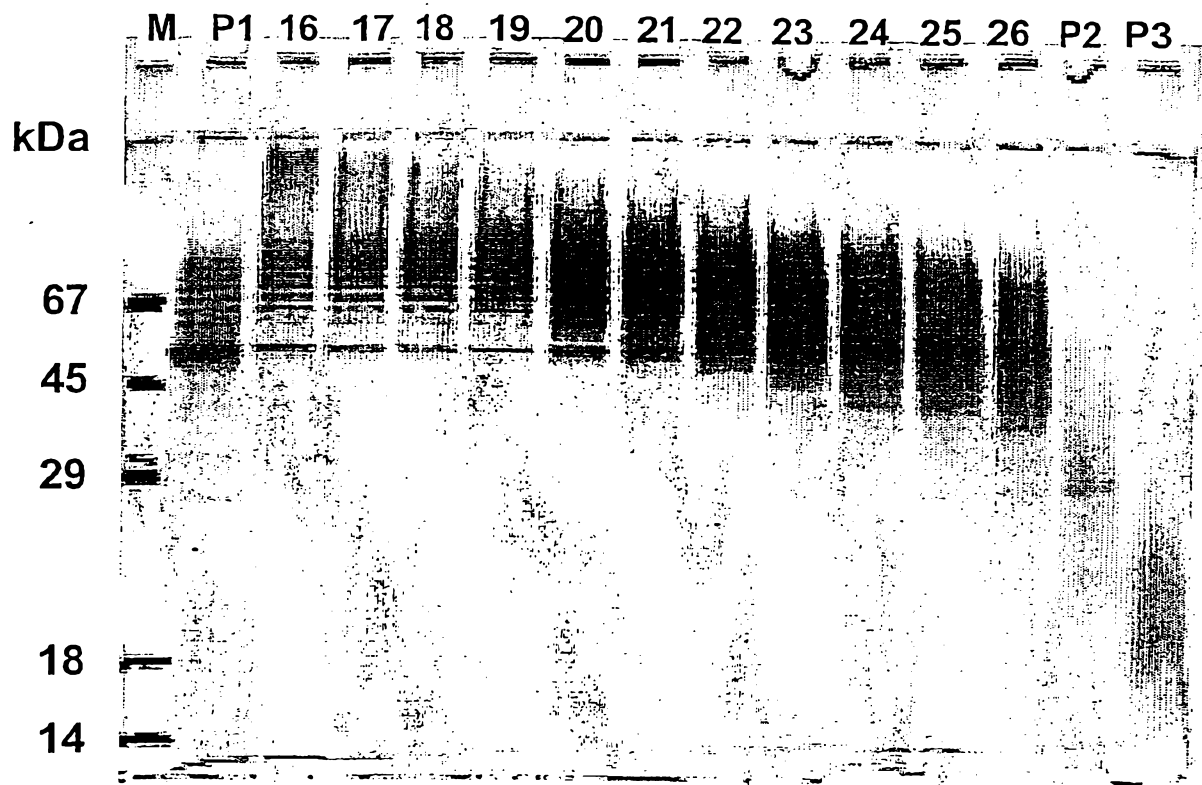
35. ábra



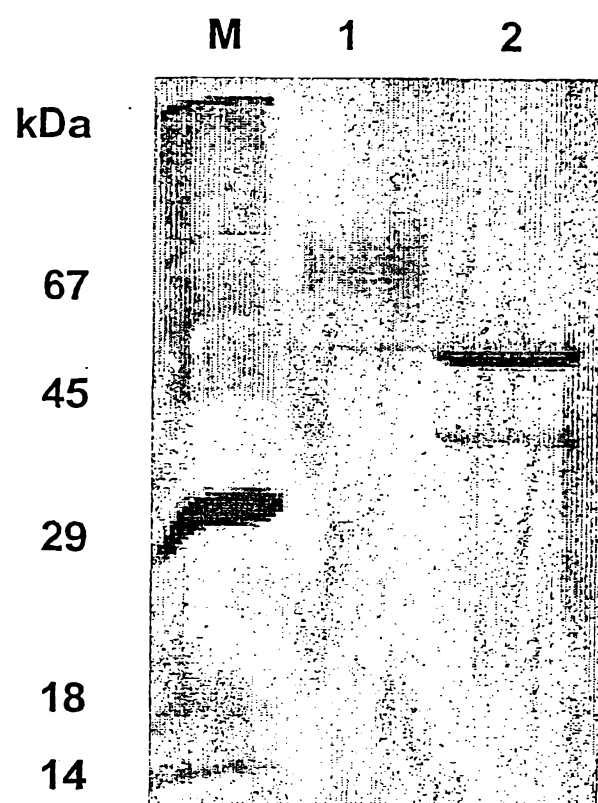
36. ábra



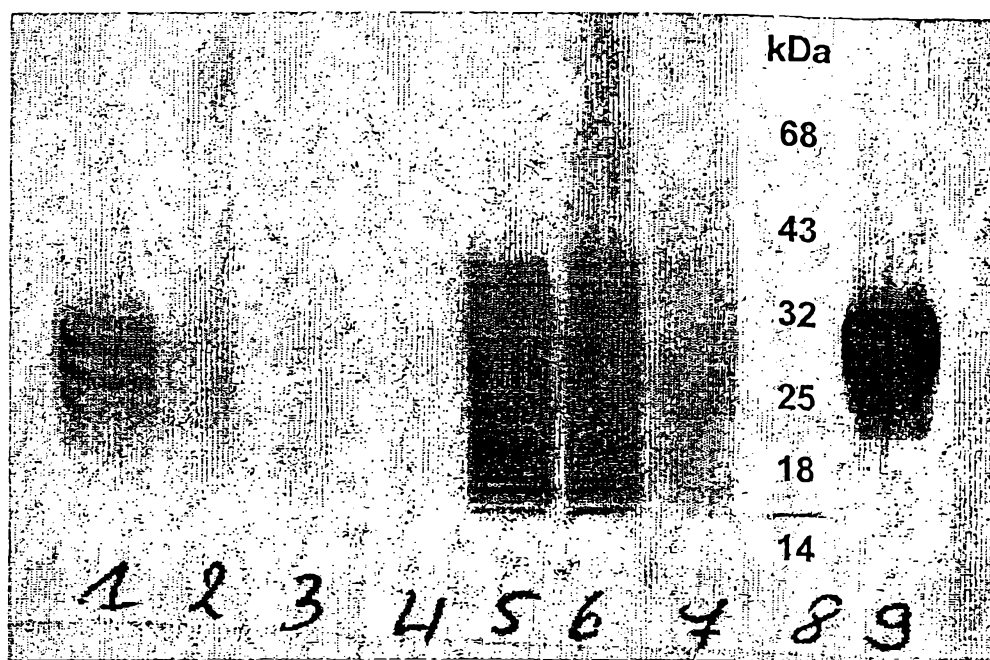
37. ábra



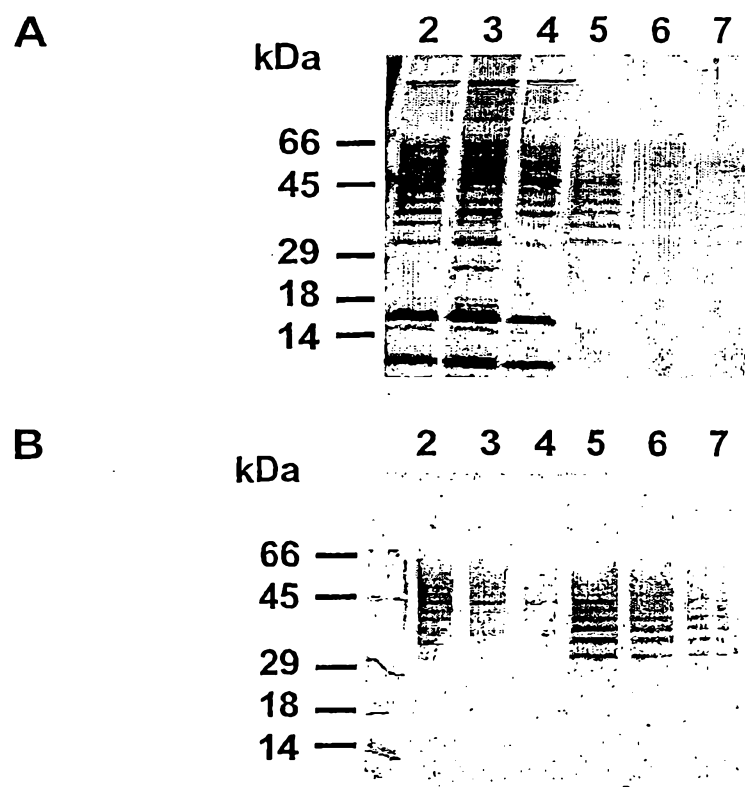
38. ábra



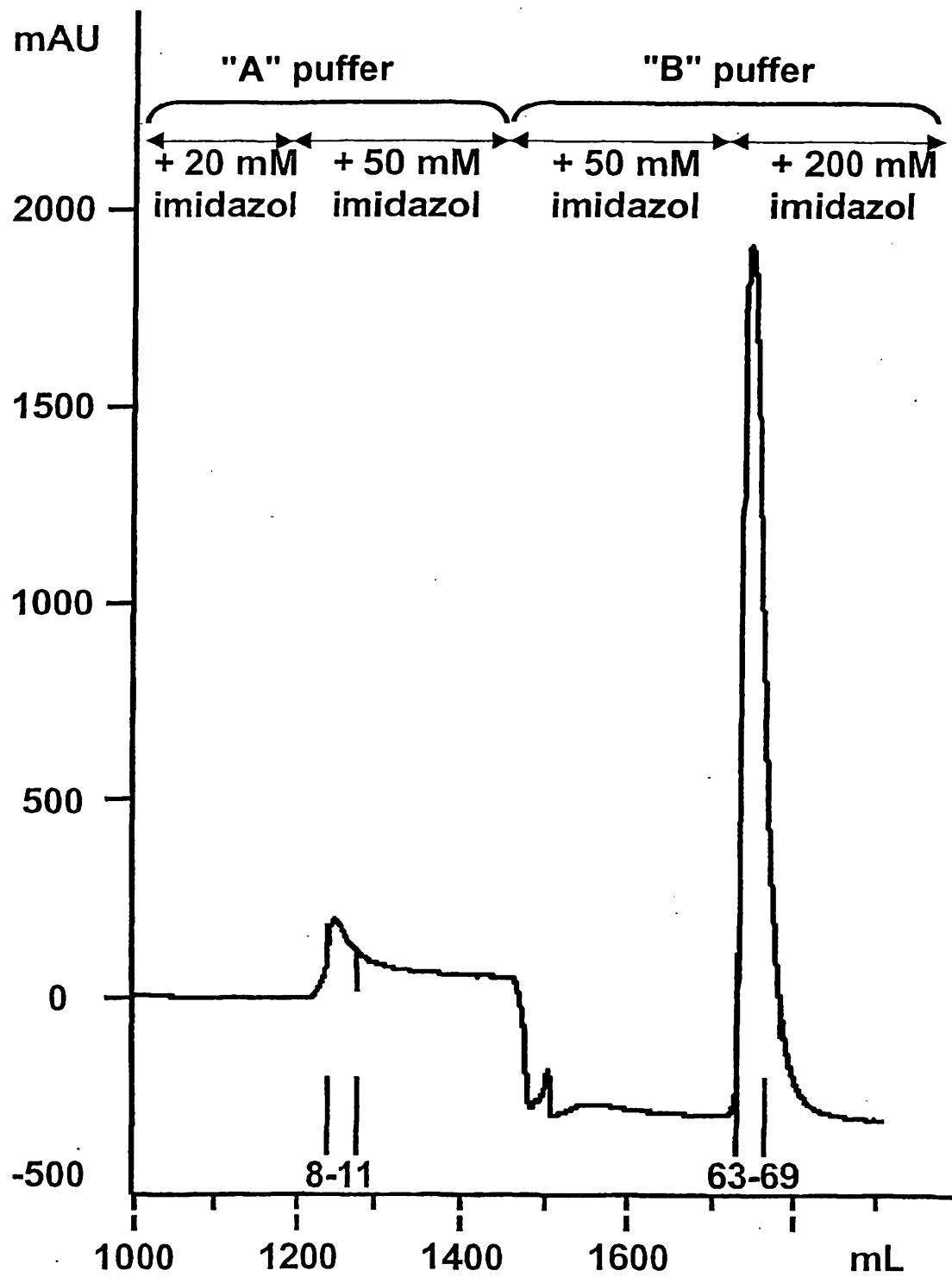
39. ábra



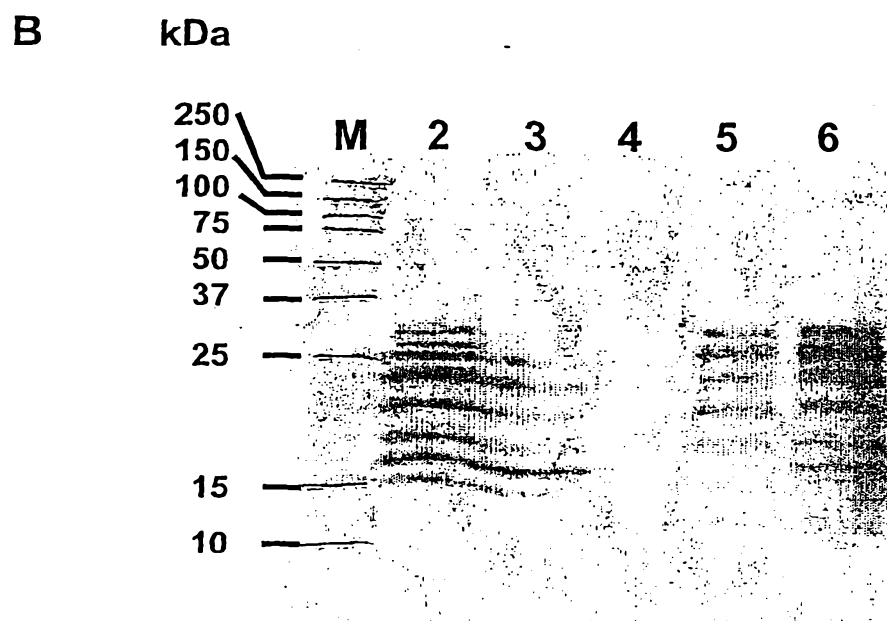
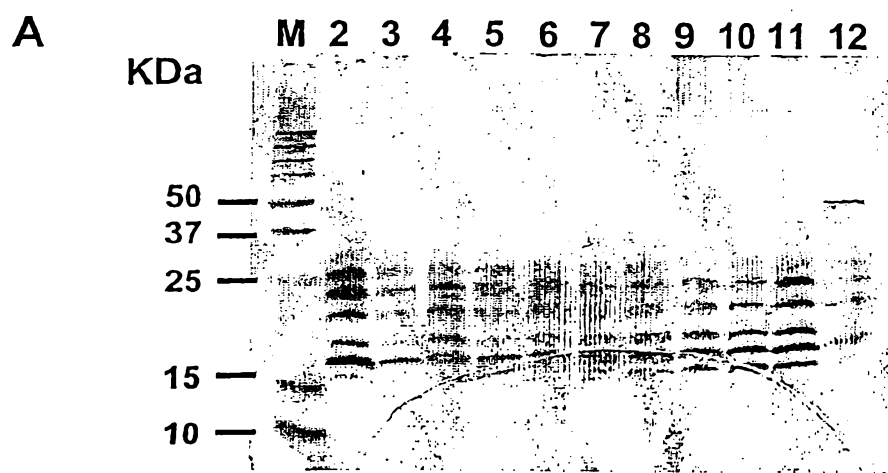
40. ábra



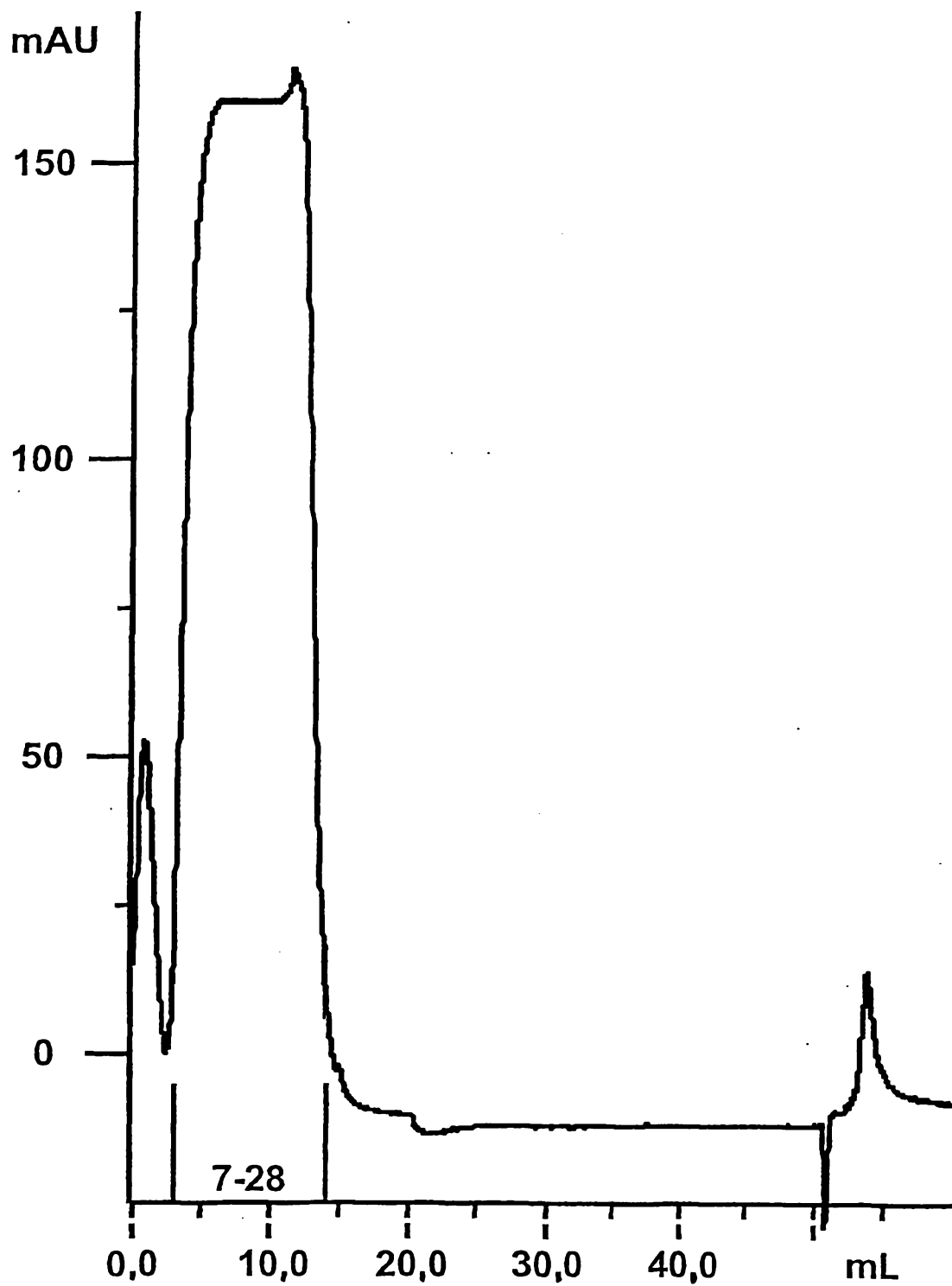
41. ábra



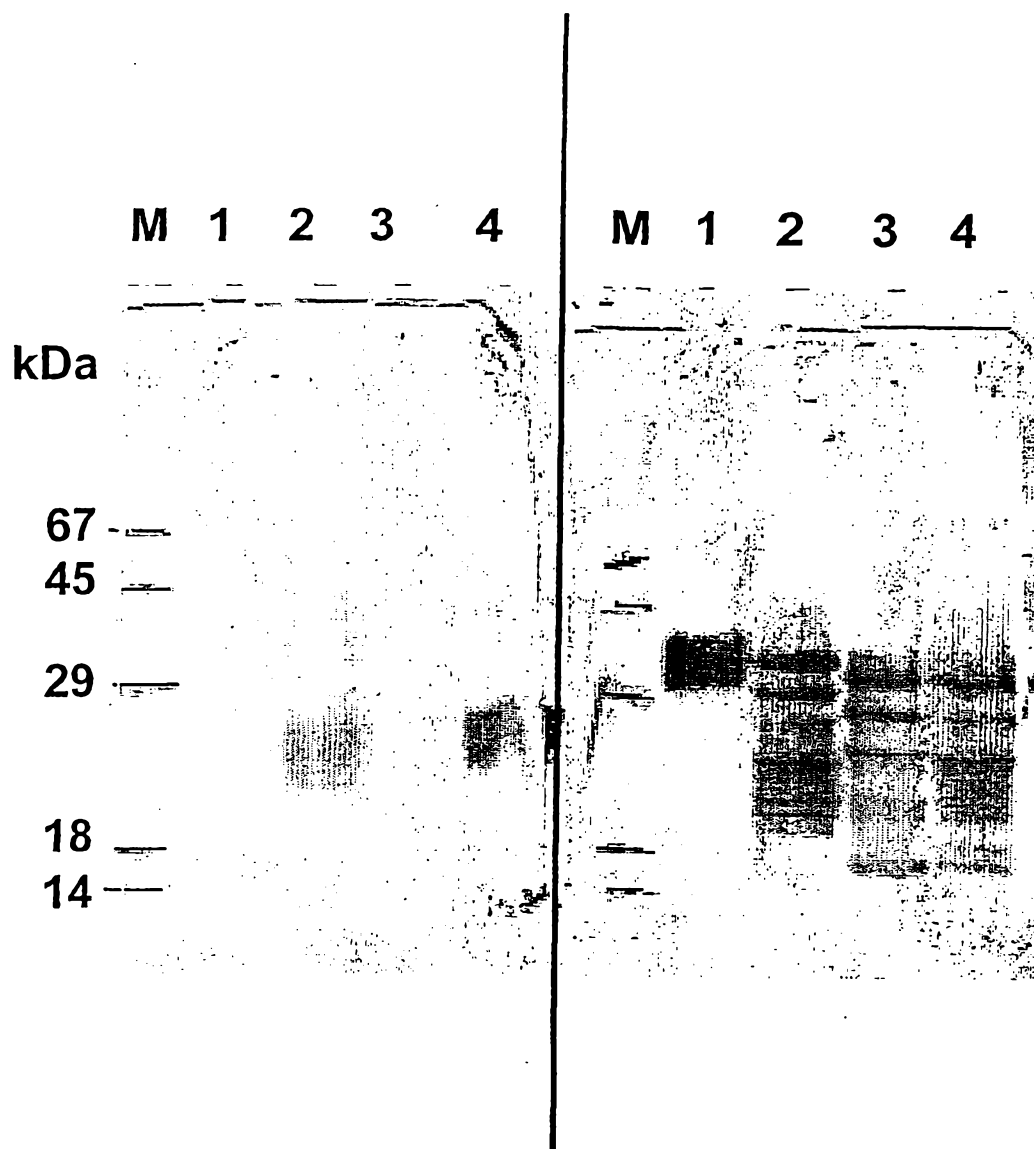
42. ábra



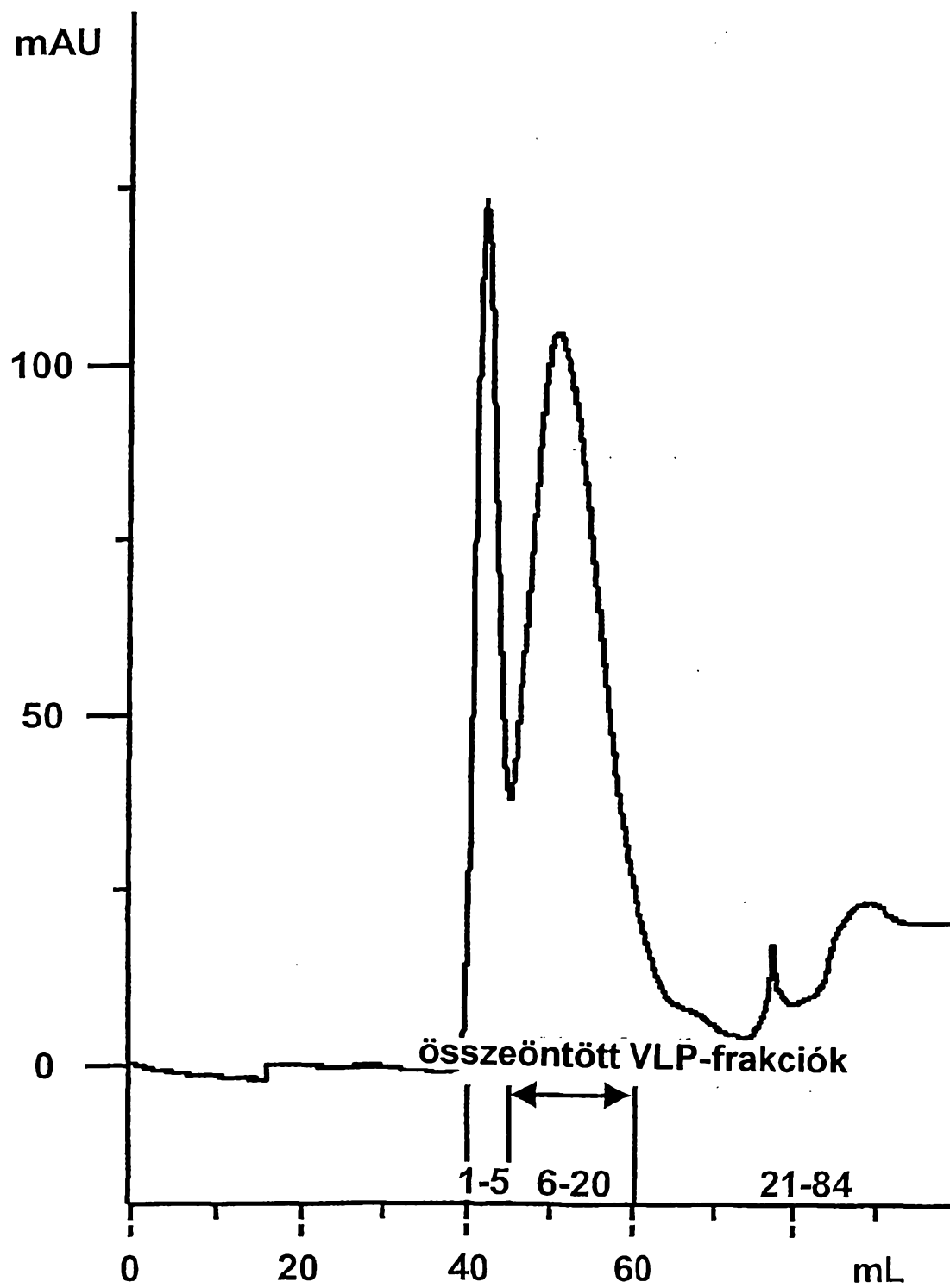
43. ábra



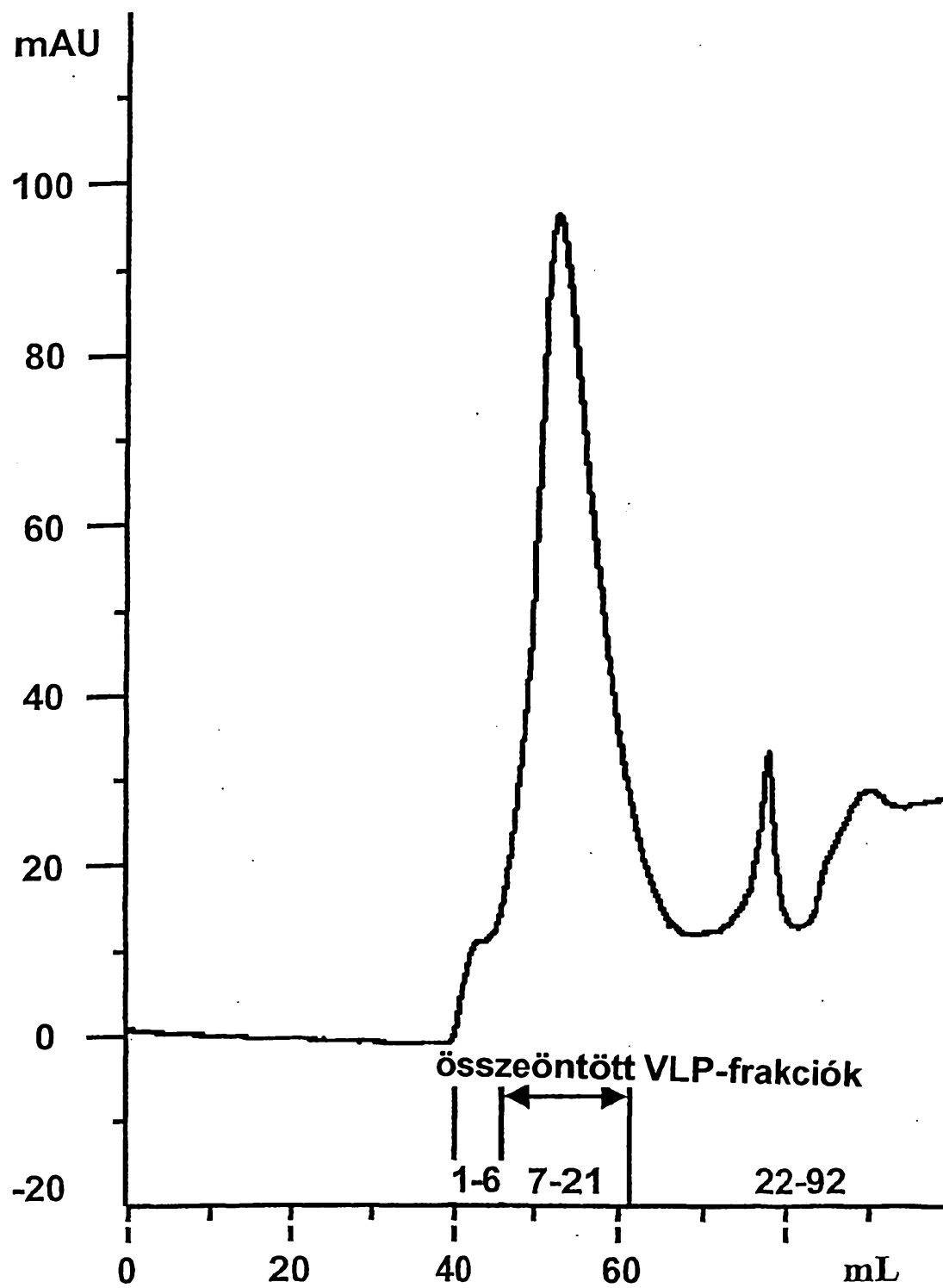
44. ábra



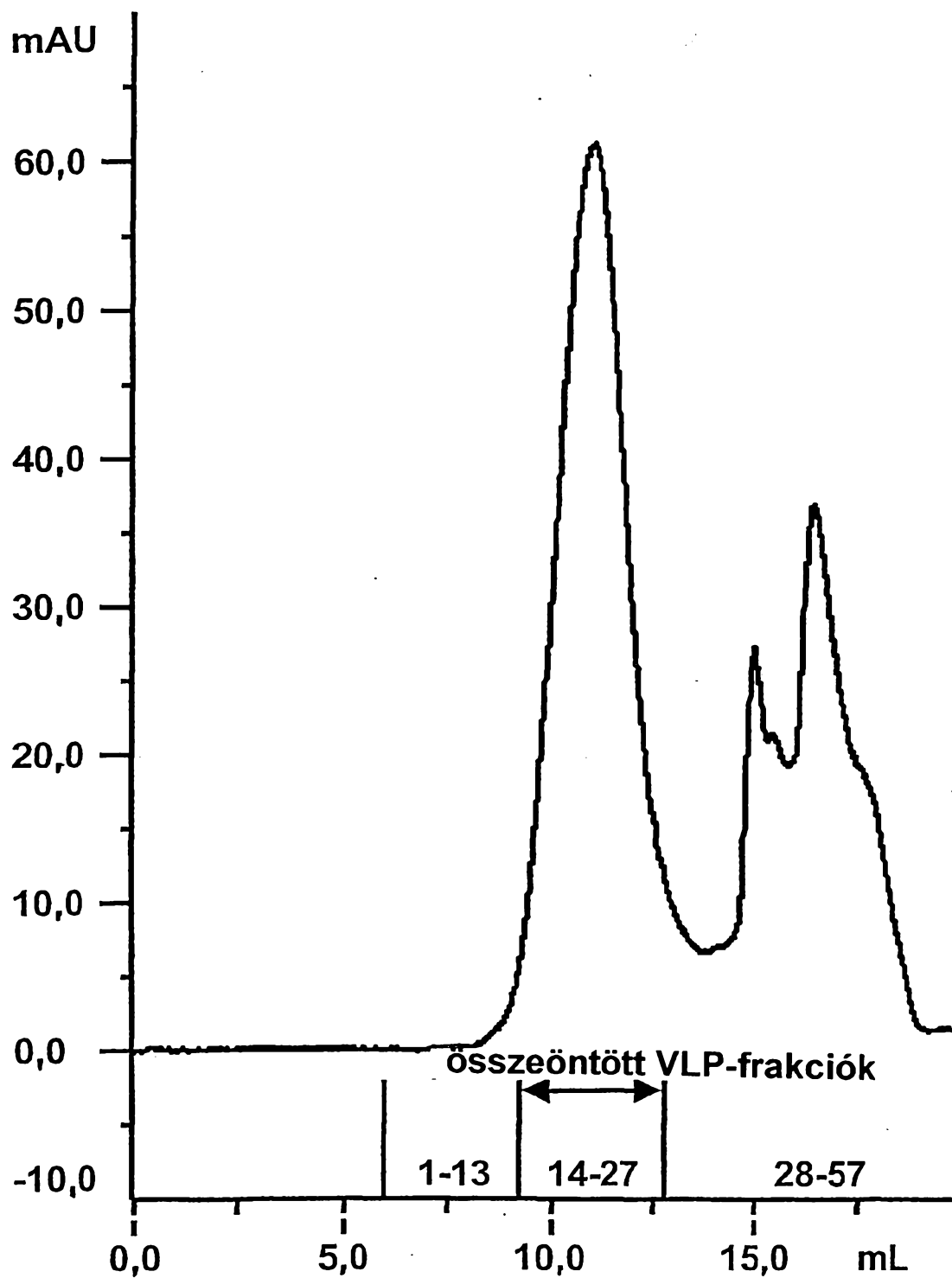
45. ábra



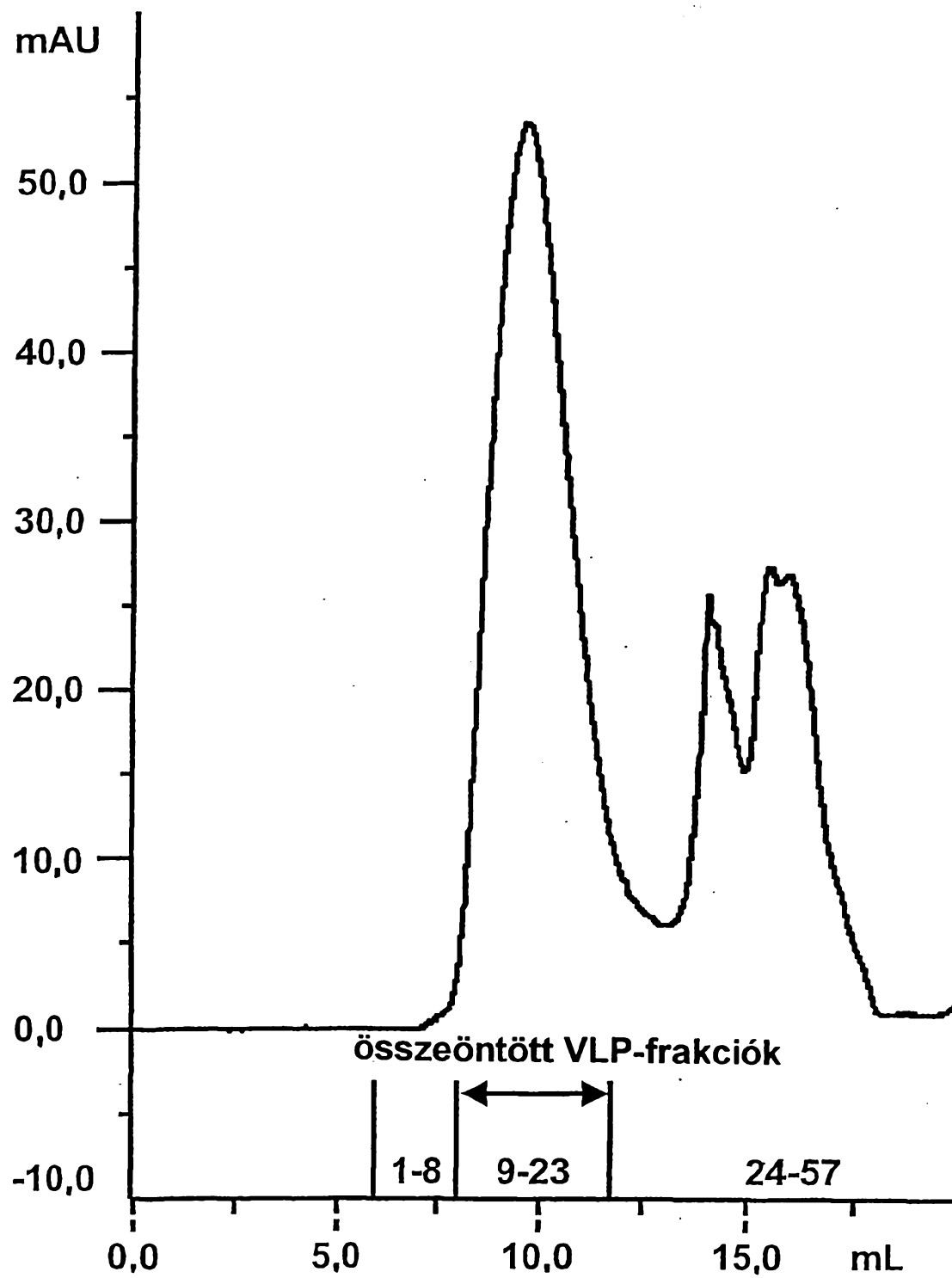
46. ábra



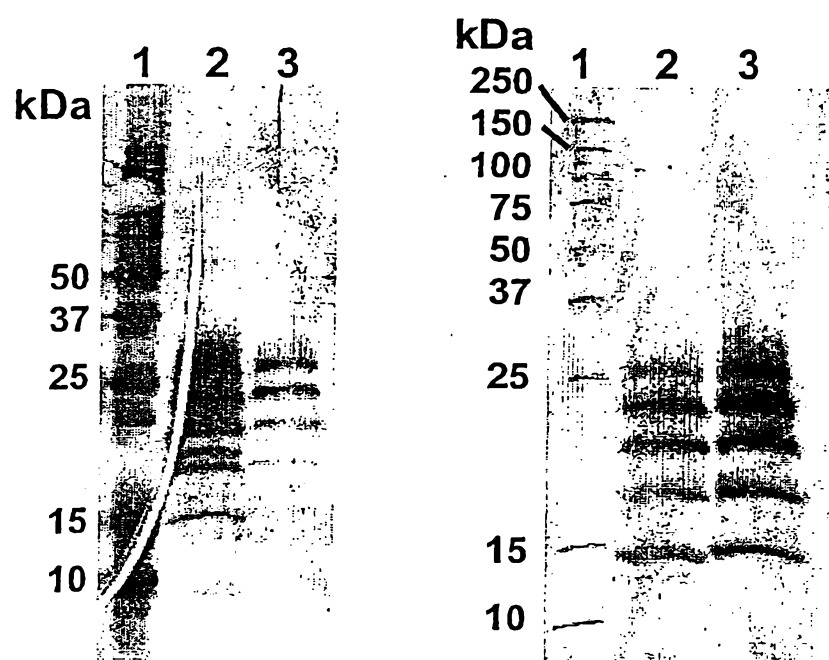
47. ábra



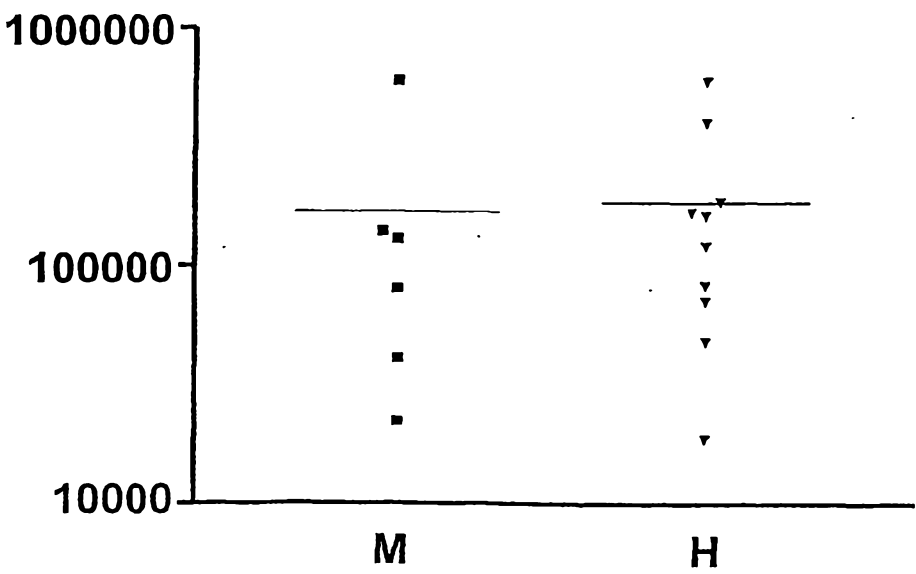
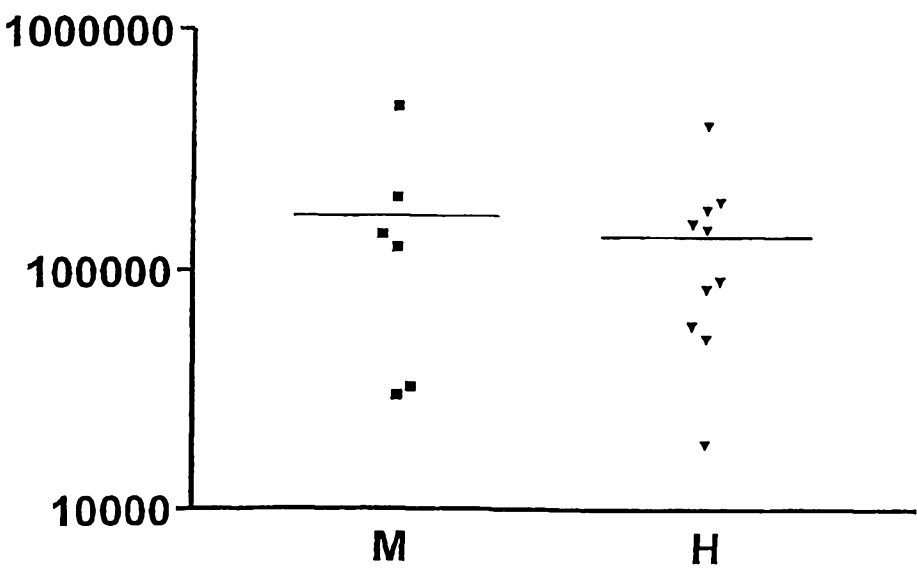
48. ábra



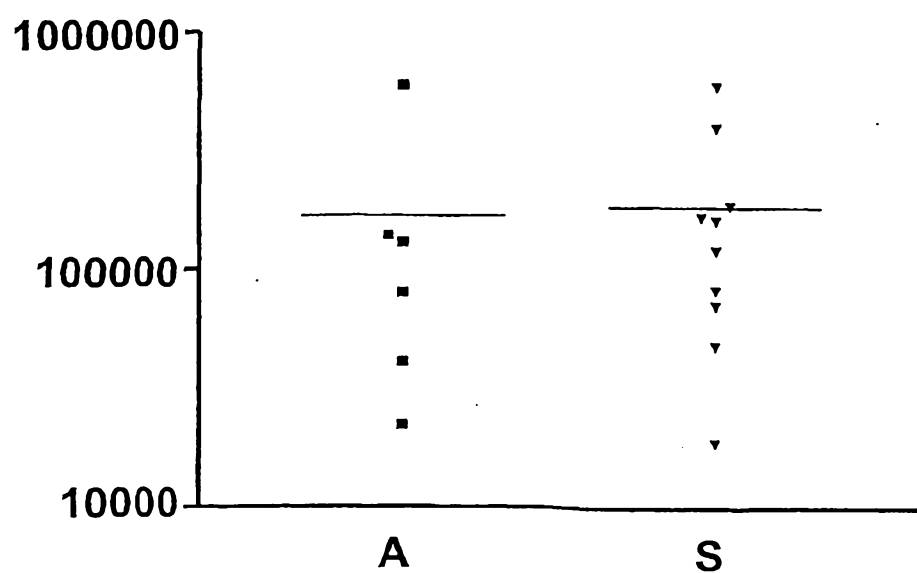
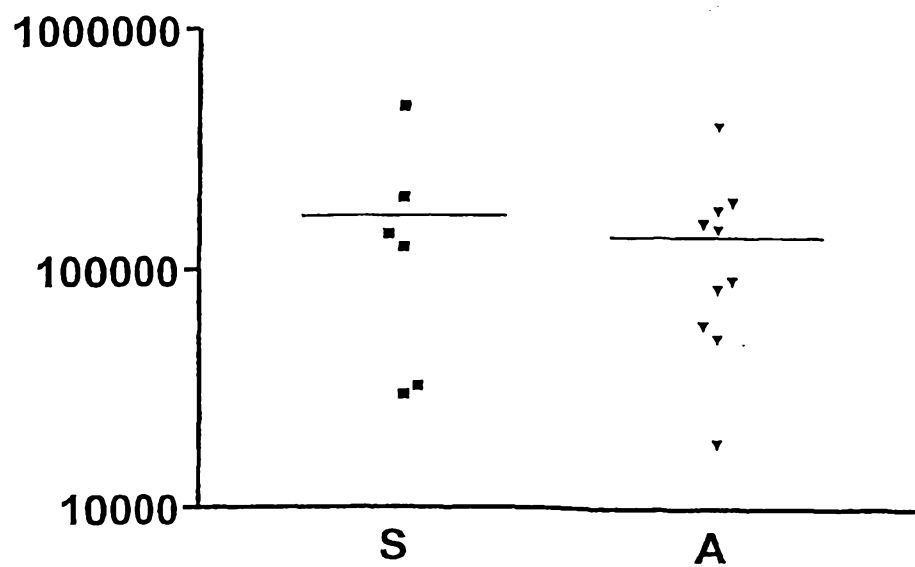
49. ábra



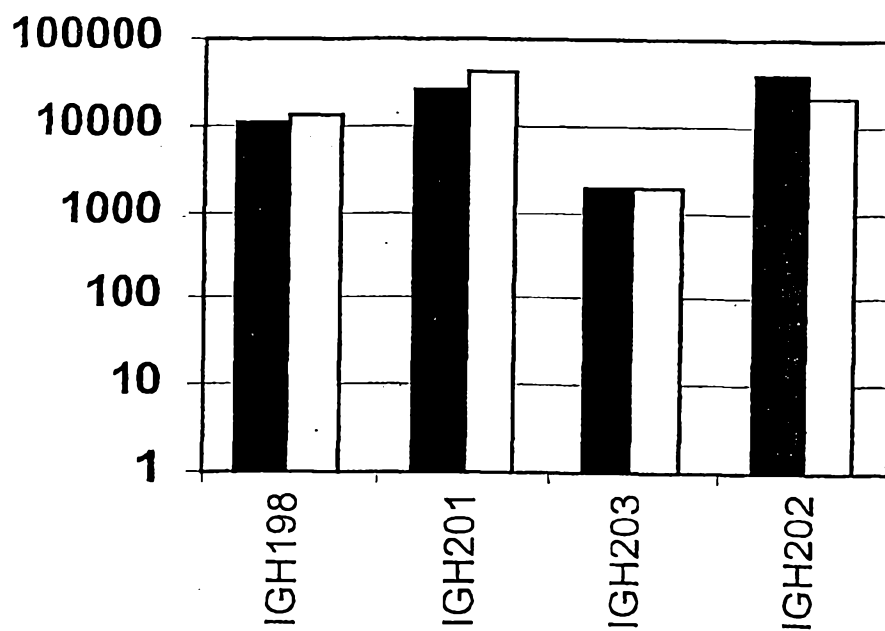
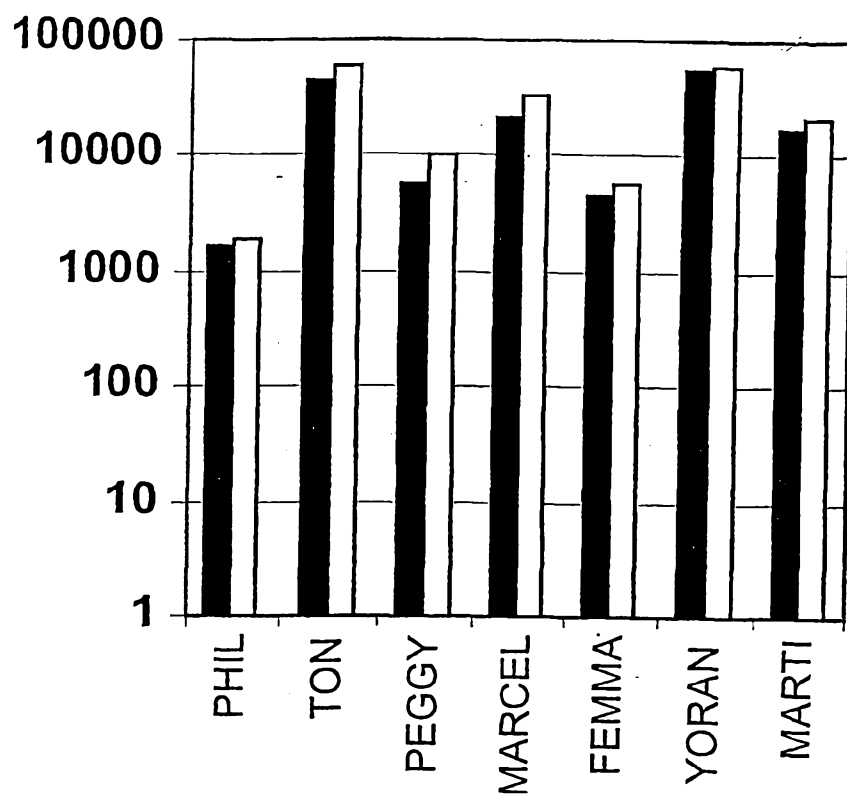
50. ábra



51. ábra



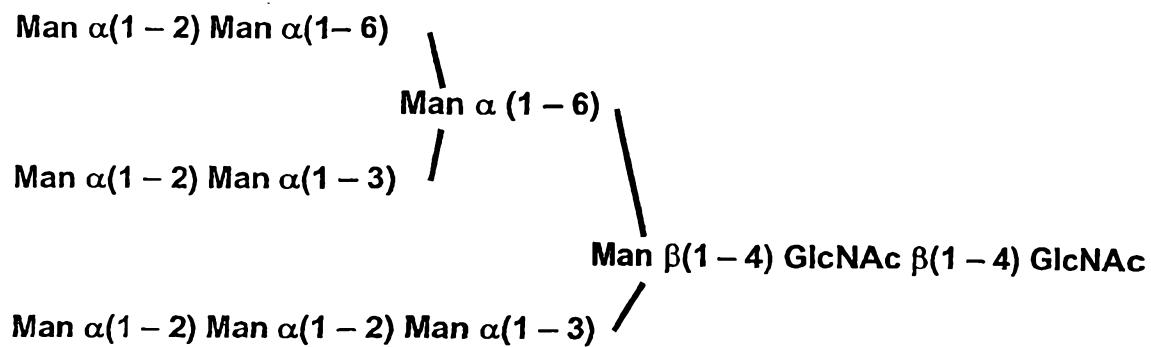
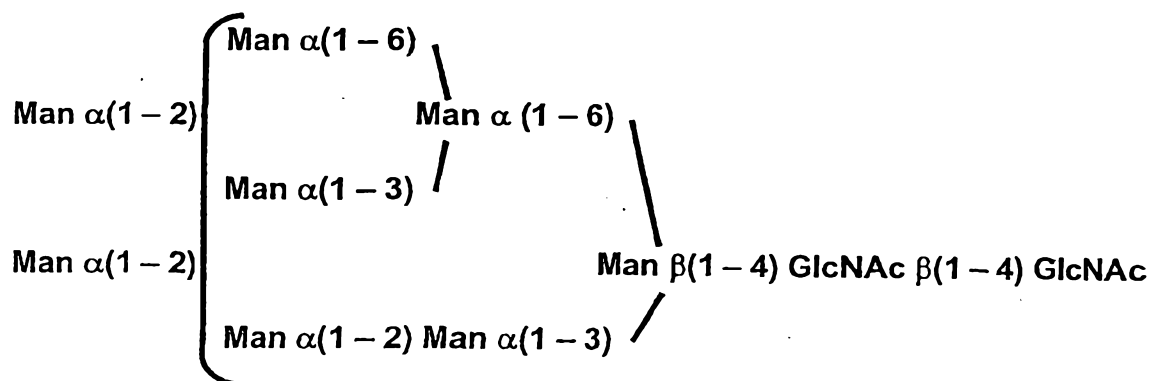
52. ábra

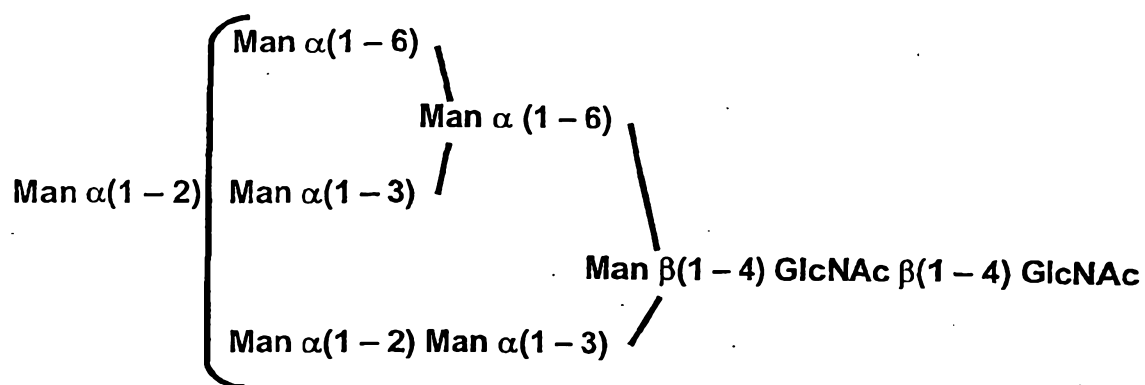
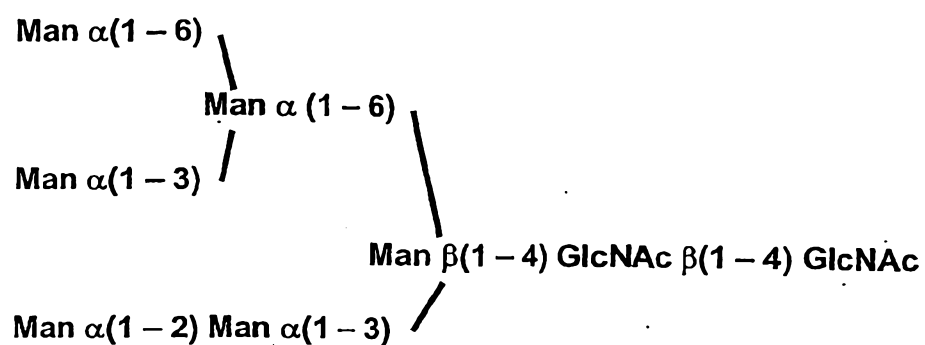


53. ábra

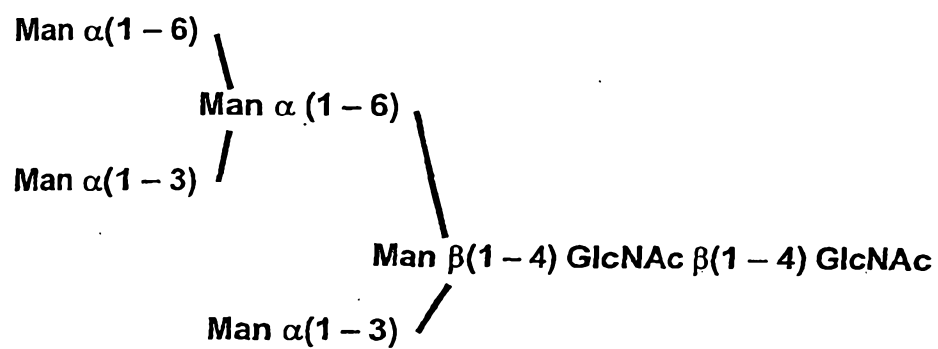


54. ábra

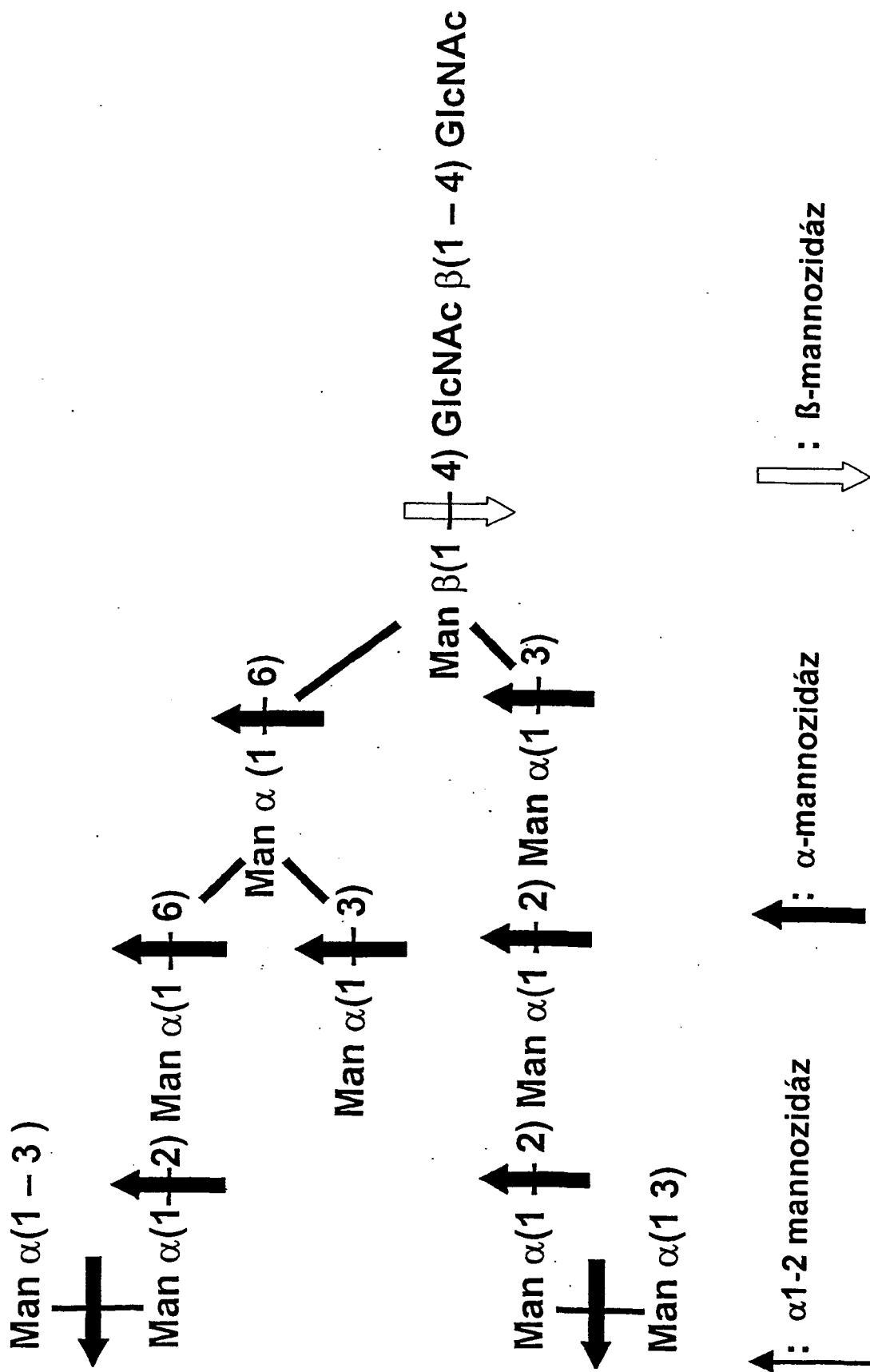
**A. MAN-9****B. MAN-8**

**C. MAN-7****D. MAN-6**

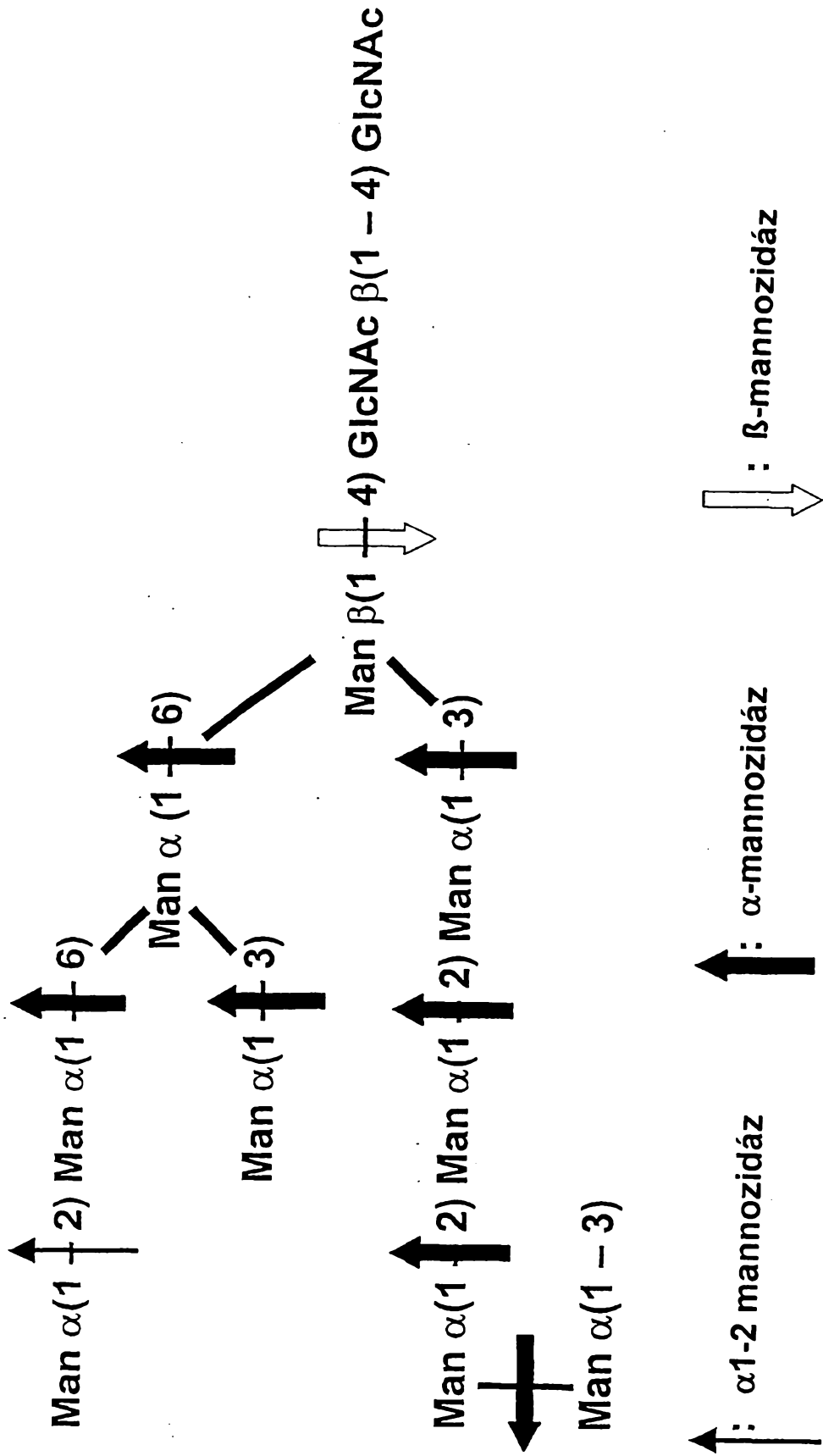
## E. MAN-5



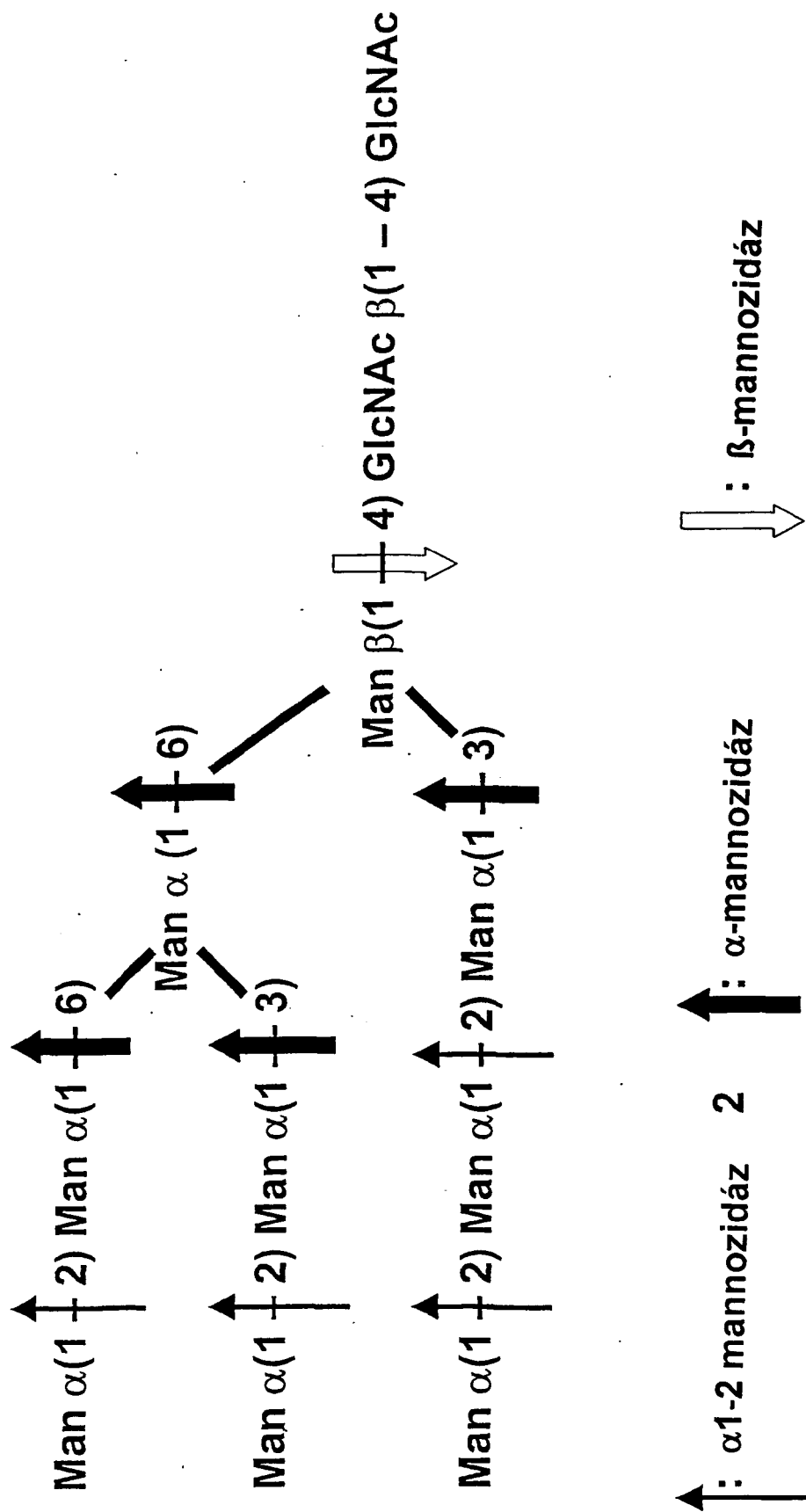
55. ábra (folytatás)



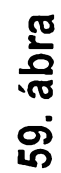
56. ábra

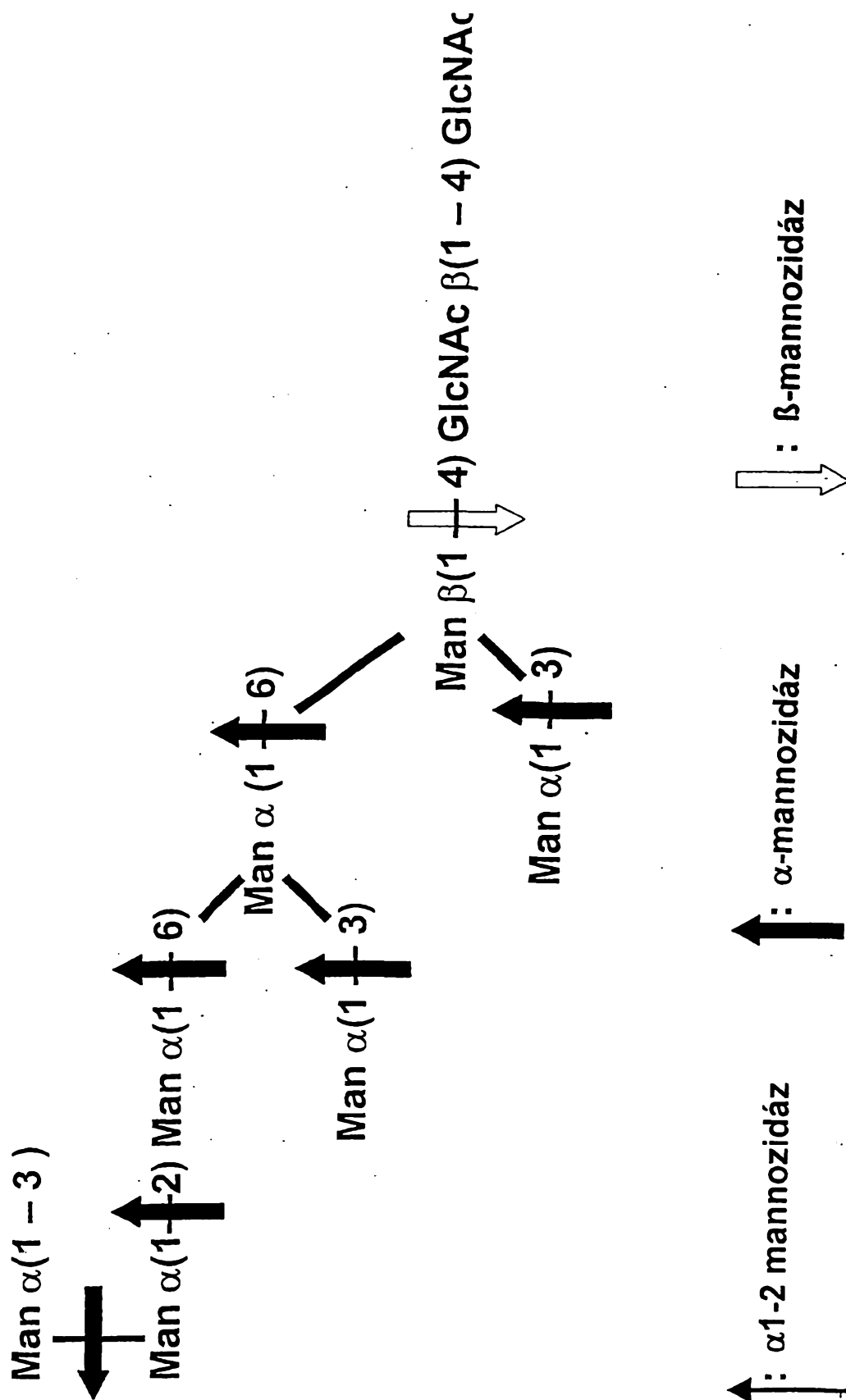


57. ábra

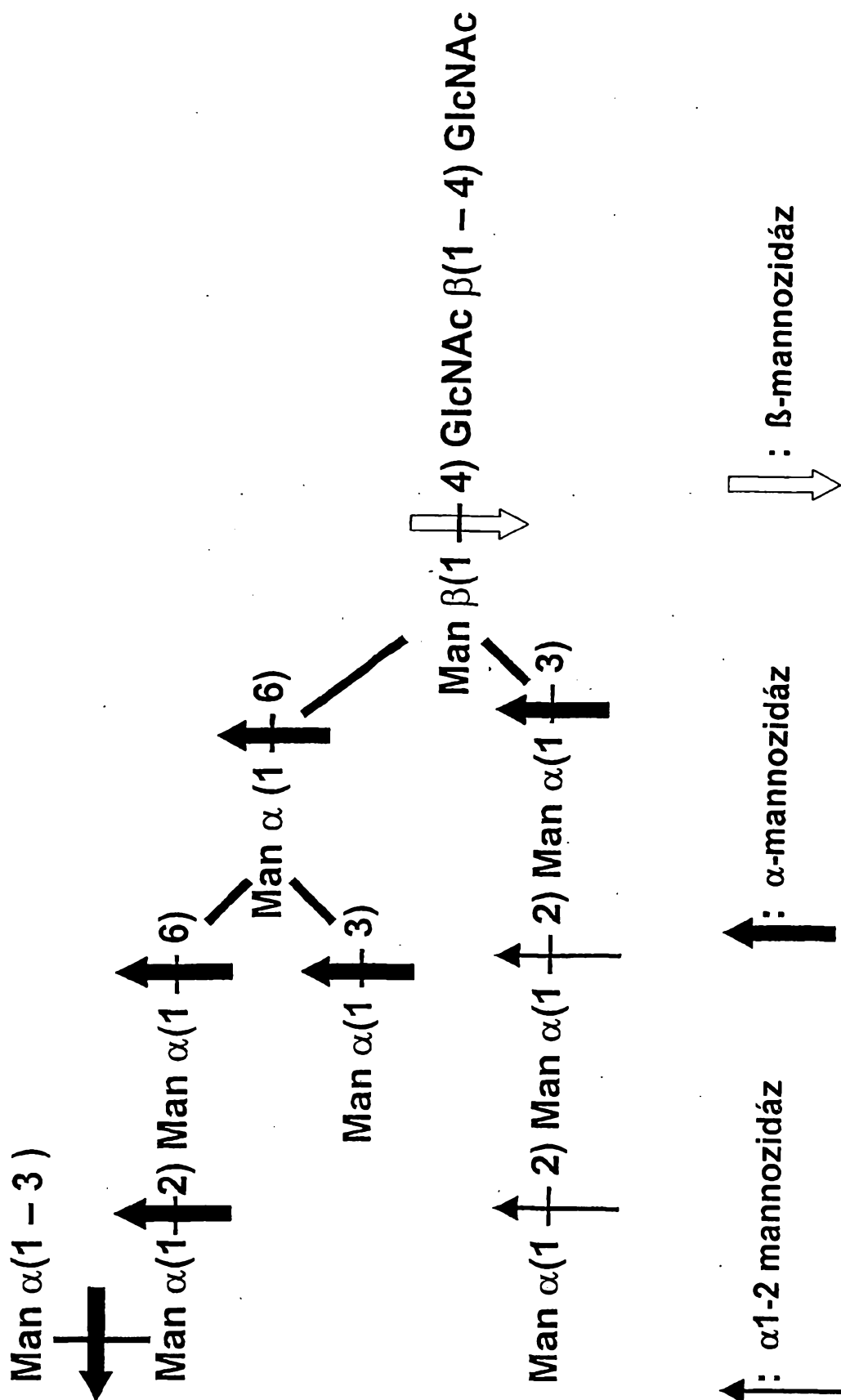


58. ábra

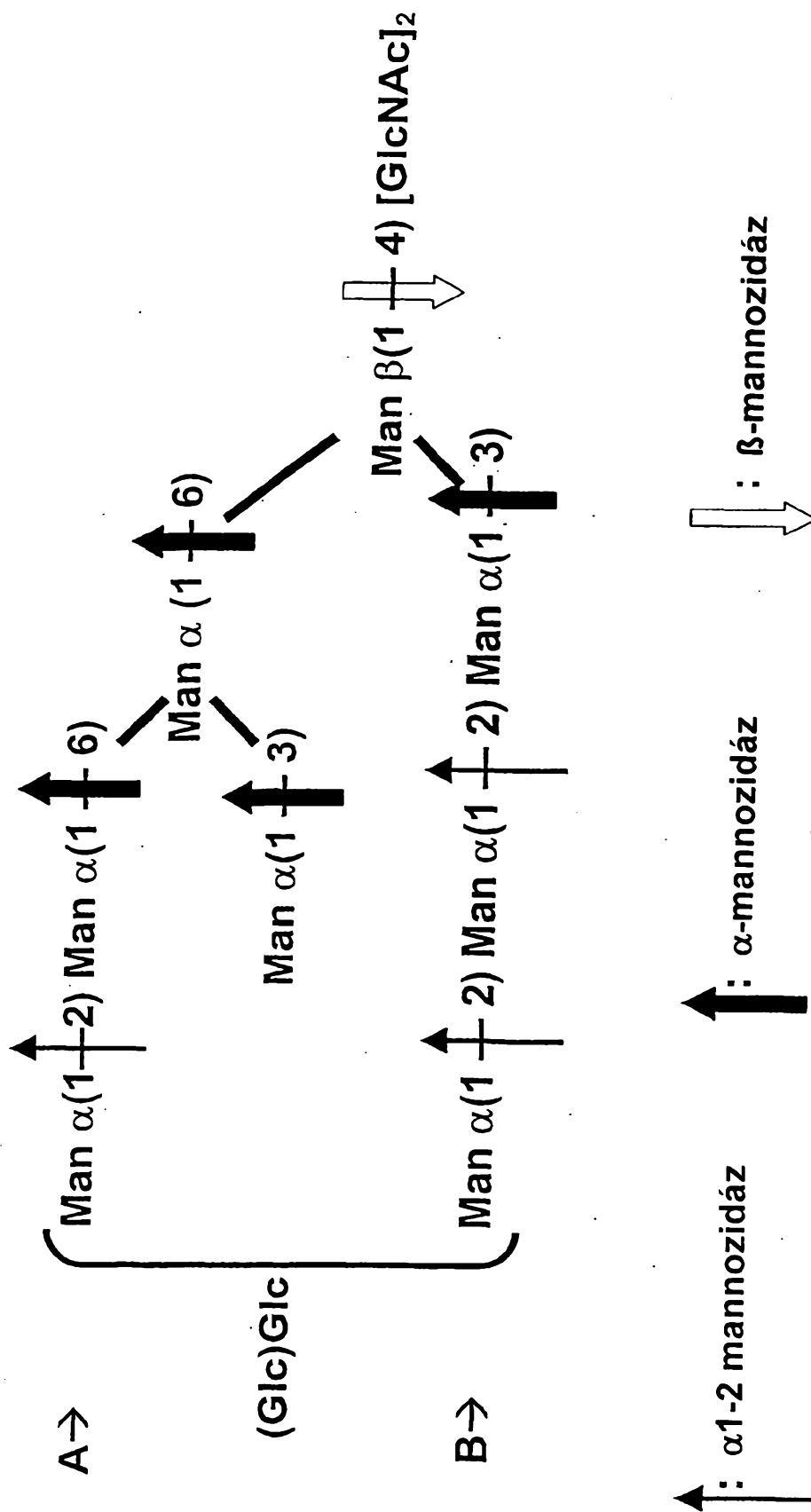




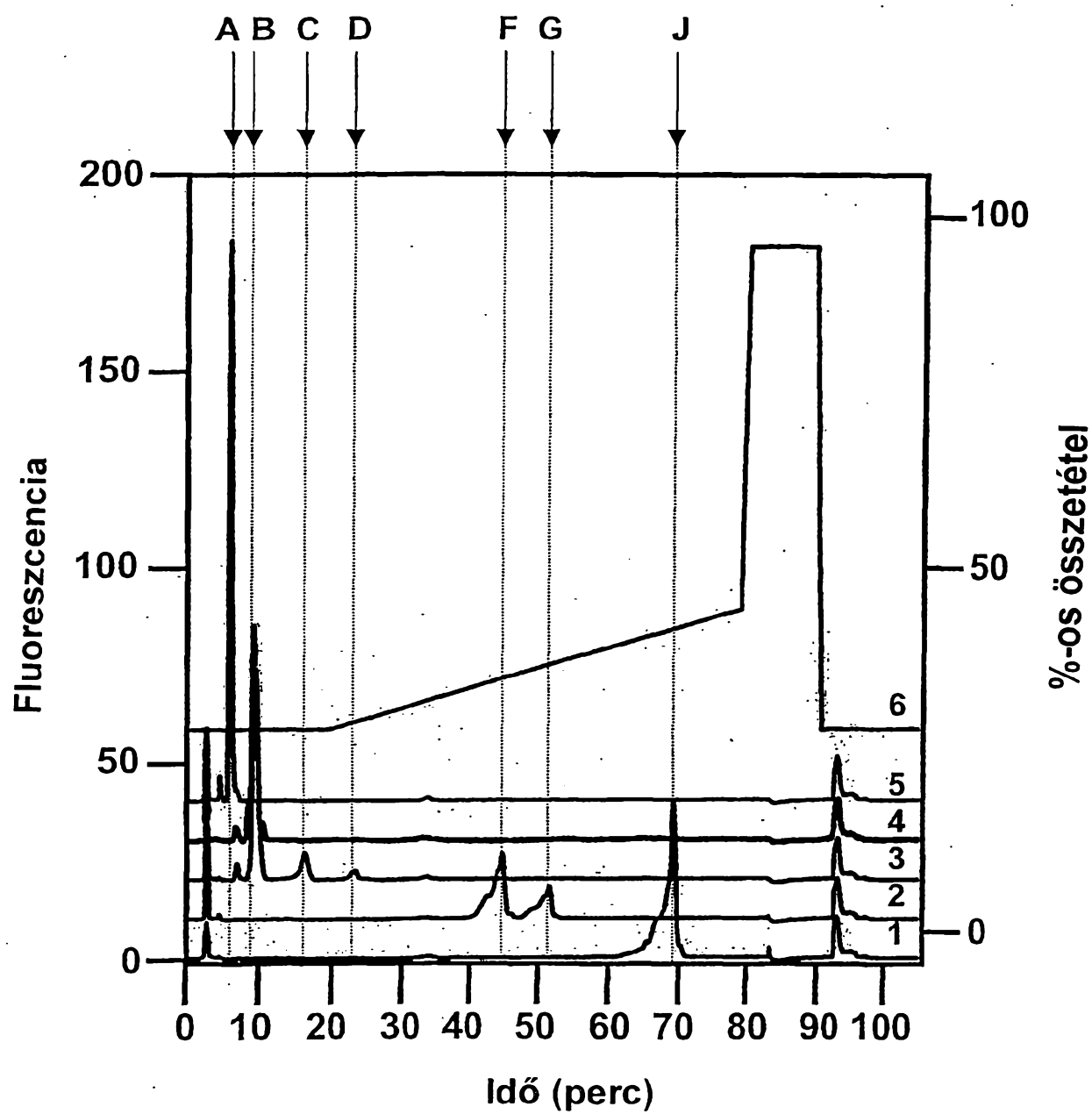
60. ábra



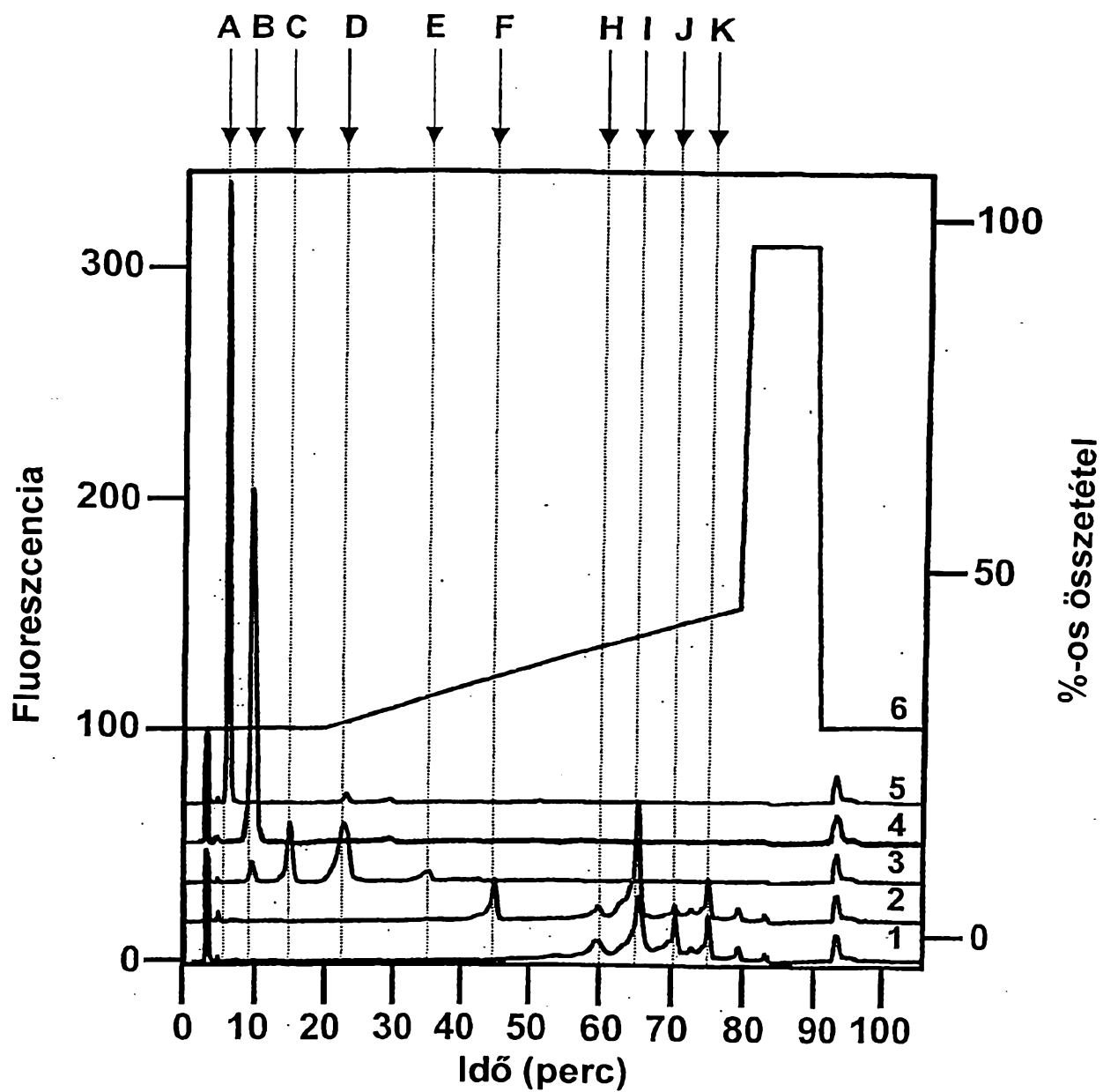
62. ábra



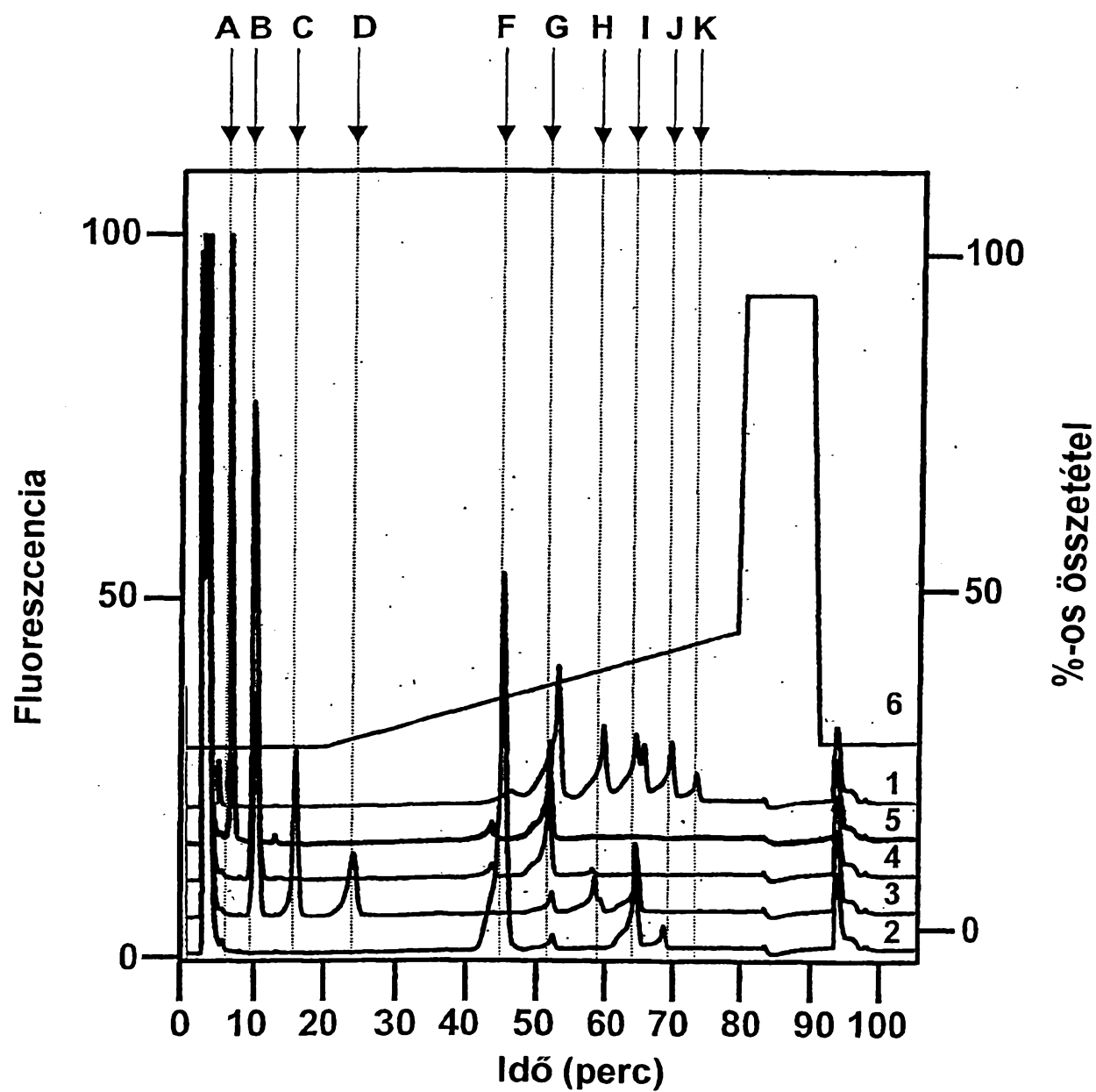
62. ábra



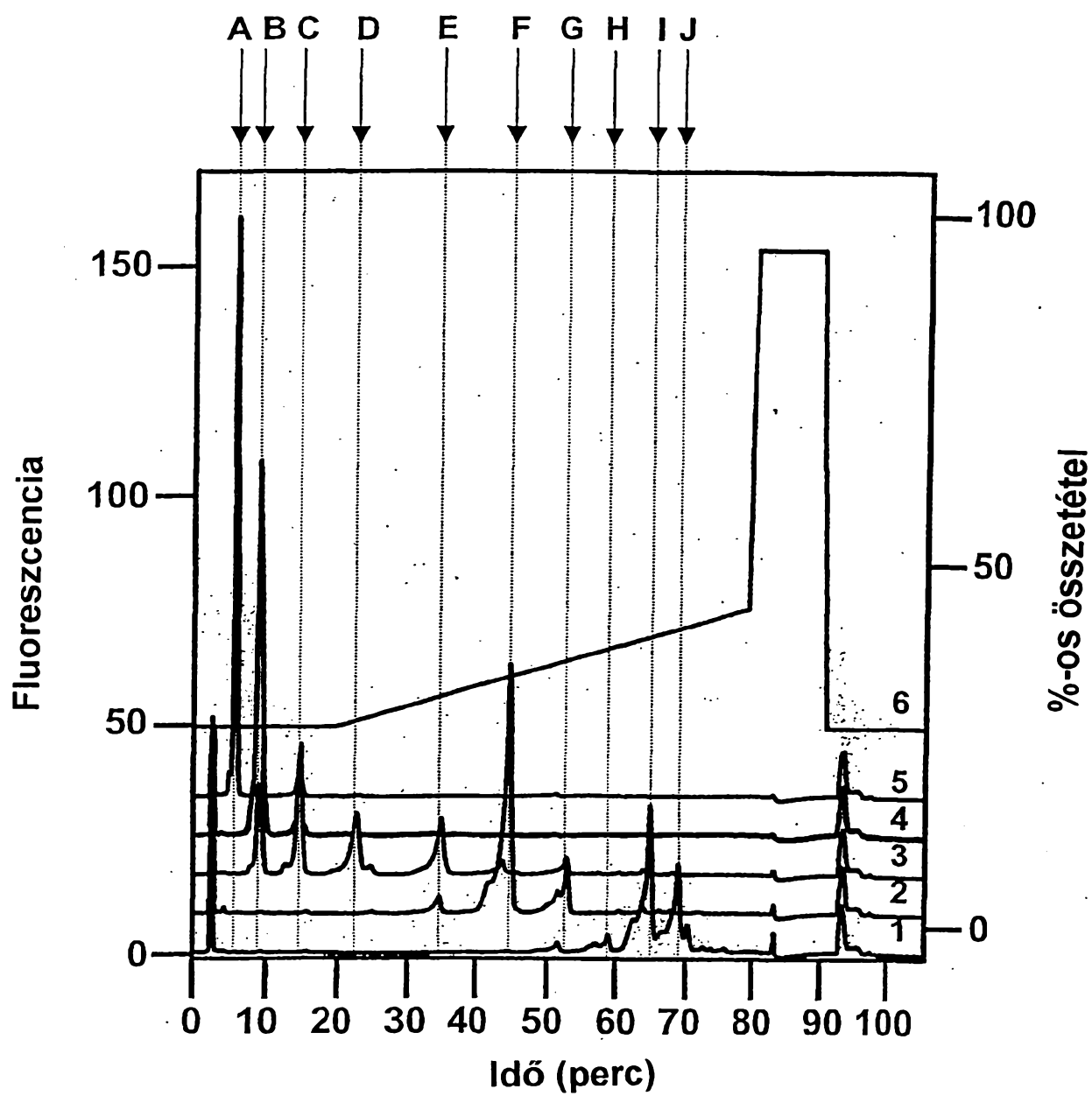
63. ábra



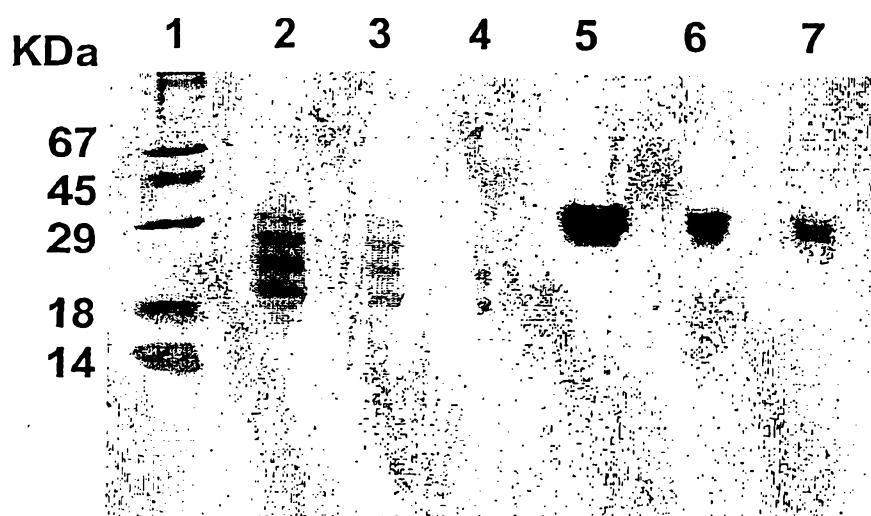
64. ábra



65. ábra



66. ábra



67. ábra

## 68. ábra