

P02 00537

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

51438

Monoklonális ellenanyagok, antigének valamint
rosszindulatú megbetegedések diagnózisa és gyógy-
kezelése

21

K I V O N A T

A találmány tárgyát monoklonális ellenanyag-szekvenciák, a találmány szerinti monoklonális ellenanyagok által megkötött antigének peptidszekvenciái, valamint találmány szerinti a monoklonális ellenanyagokat és a peptideket alkalmazó diagnosztikai és terápiás vizsgálati eljárások képezik.

Jellemező a bra:φ

FL

**Monoklonális ellenanyagok, antigének valamint
rosszindulatú megbetegedések diagnózisa és gyógy-
kezelése**

A találmány tárgyát monoklonális ellenanyag-szekvenciák, a találmány szerinti monoklonális ellenanyagok által megkötött antigének peptidszekvenciái, valamint találmány szerinti a monoklonális ellenanyagokat és a peptideket alkalmazó diagnosztikai és terápiás vizsgálati eljárások képezik.

A WO 95/20605 számú nemzetközi szabadalmi iratunkban immunstimuláns monoklonális ellenanyagokat tettünk közzé. Az említett szabadalmi irat tárgyát képező B lymphoblastoid sejtek ellen termelt ellenanyagokról kimutattuk, hogy immunstimuláns hatásúak. Daganatos állatokba injektálva ezek az ellenanyagok daganatellenes hatással rendelkeztek.

A jelenlegi gyógyászati eljárásoknak megfelelően a daganatdiagnosztika jellemzően többlépcsős folyamat, amely fizikai vizsgálatot, különféle képalkotó eljárások alkalmazását, valamint számos daganatmarker használatát foglalja magában. Régóta szükség lenne olyan daganatdiagnosztikai eljárásokra, amelyek nemcsak a daganat korai kimutatását, hanem típusának korai meghatározását is lehetővé teszik.

A találmány alapját lymphoblastoid sejtek elleni ellenanyagok szekvenciáinak meghatározása képezi. A találmány szerinti megoldás továbbá azon a felismerésen alapul, hogy



az ellenanyagok az egészséges páciensek T-sejtjeihez történő kötődésüknél tapasztaltakhoz képest daganatos megbetegedésben szenvedő páciensek T-sejtjeihez eltérő (nagyobb vagy alacsonyabb) mértékben kötődnek.

Egy szempontból a találmány tárgyát a következők alkotta csoport bármely tagjának megfelelő, variábilis régiót tartalmazó monoklonális ellenanyag képezi:

(a) az 1. ábrán található aminosav-szekvenciával rendelkező variábilis nehézlánc-régiót tartalmazó monoklonális ellenanyag;

(b) a 2. ábrán található aminosav-szekvenciával rendelkező variábilis kappa könnyűlánc-régiót tartalmazó monoklonális ellenanyag;

(c) az 1. ábrán található aminosav-szekvenciával rendelkező variábilis nehézlánc-régiót valamint a 2. ábrán található aminosav-szekvenciával rendelkező variábilis kappa könnyűlánc-régiót tartalmazó monoklonális ellenanyag;

(d) az 1. ábrán található aminosav-szekvenciával legalább 70%-os szekvencia-azonosságot mutató variábilis nehézlánc-régiót tartalmazó monoklonális ellenanyag;

(e) a 2. ábrán található aminosav-szekvenciával legalább 70%-os szekvencia-azonosságot mutató variábilis könnyűlánc-régiót tartalmazó monoklonális ellenanyag.

A találmány szerinti megoldásban "ellenanyag" kifejezés alatt az IgG, IgM, IgD, IgA és IgE osztályok bármelyikébe sorolt monoklonális ellenanyagot értünk. A kifejezés egyaránt magában foglalja a teljes ellenanyagokat, vagy az azok antigénkötő doménját tartalmazó ellenanyag-fragmense-

ket, pl. az Fc-rész nélküli ellenanyagokat, az egyláncú ellenanyagokat, az alapvetően csupán az ellenanyag variábilis antigénköti doménját tartalmazó fragmenseket stb.

Mindezek mellett a találmány tárgyát képezik azok az ellenanyagok is, amelyek a fentiekben bemutatott monoklonális ellenanyagok által megkötött antigénekhez kötődnek, vagyis amelyek a fentiekben említett ellenanyagokkal keresztreakciót mutatnak.

A találmány egy megvalósítási módjában a monoklonális ellenanyag emberi-egér kiméra ellenanyag, vagyis emberi konstans régióval és egér eredetű variábilis régióval rendelkező monoklonális ellenanyag. Erre a célra a találmány szerinti monoklonális ellenanyag variábilis kappa könnyűlánc- és nehézlánc-régióit PCR-klónoztuk és DNS-üket szekvenáltuk. A találmány egy további megvalósítási módjában az ellenanyag teljes mértékben humanizált ellenanyag, vagyis mind variábilis, mind konstans régiói emberi eredetűek.

A "legalább x%-os azonosságot mutató" kifejezés az optimálisan egymás alá rendezett szekvenciákban megegyező aminosavak százalékos arányára utal. Ennek megfelelően a 70%-os szekvencia-azonosság azt jelenti, hogy két vagy több, optimálisan egymás alá rendezett polipeptid-szekvencia aminosavainak 70%-a megegyezik. A szekvencia-azonosság mértéke előnyösen legalább 80%, legelőnyösebben pedig legalább 90%.

Egy további szempontból a találmány tárgyát a találmány szerinti monoklonális ellenanyagok bármelyikét termelő egér hibridóma sejtvonalak képezik. A hibridómák a szakem-

ber számára ismert számos eljárás bármelyikével előállíthatók [pl. Kohler, G. és Milstein, C.: Nature 256, 465 (1975)]. A hibridóma sejtvonalak tenyészetének felülúszóját ellenanyagkötő aktivitás kimutatása érdekében jellemzően a szakember számára ismert számos eljárás egyikével pl. enzimakcsolt immunoszorbens vizsgálati eljárással (ELISA-val), vagy radioimmun-vizsgálati eljárással (RIA-val) szkrínelik. A felülúszókat a találmány szerinti peptidek bármelyikéhez (ld. lentebb), vagy bizonyos sejtekhez (pl. Daudi sejtekhez vagy T-limfocitákhoz) kötődő monoklonális ellenanyagok jelenlétére szkrínelik.

A találmány tárgyát képezik továbbá a fenti monoklonális ellenanyagok nehéz- vagy könnyűláncának bármely aminosav-szekvenciáját kódoló DNS-szekvenciák is. Amint az szakember számára feltétlenül nyilvánvaló, a genetikai kód degeneráltságának köszönhetően a találmány szerinti monoklonális ellenanyagokat az 1. vagy 2. ábrán bemutatott nukleinsav-szekvenciákon kívül számos más nukleinsav-szekvencia is kódolhatja.

A találmány tárgyát képezik továbbá expressziós vektorok, pl. a DNS-szekvenciákat tartalmazó plazmidok, valamint az ezen expressziós vektorok közül egyet vagy többet tartalmazó gazdasejtek is.

Egy további szempontból a találmány tárgyát képezik azok a B-sejt antigén peptidszekvenciák is, amelyekhez a találmány szerinti monoklonális ellenanyagok kötődni képesek. A nem-redundáns génbank adatbázisban és az EST-rész-

legben folytatott keresések alapján ezek új peptidszekvenciáknak felelnek meg.

E szempontnak megfelelően a találmány tárgyát képezi továbbá az alábbiak alkotta csoport bármely tagjának megfelelő peptid is:

(a) a 10. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciával rendelkező peptid;

(b) a 11. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciával rendelkező peptid;

(c) a 12. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciával rendelkező peptid;

(d) az (a), (b) és (c) jelű peptidek aminosav-szekvenciáival legalább 85%-os azonosságot mutató peptid;

(e) az (a)-(d) pontbeli peptidek közül egyet vagy többet tartalmazó protein vagy peptid.

A találmány szerinti peptidek számos diagnosztikai vizsgálati eljárás céljára igénybevehetők, így például alkalmazhatók kompetitív immun-vizsgálati eljárásokban, amelyben a monoklonális ellenanyagnak a T-sejt felületén található természetes antigénjéhez történő kötődése mértékének megállapítására kerül sor. Emellett állatoknak a peptidekkel történő immunizálásával a fentiekben vagy az alábbiakban ismertetett felhasználási módok bármelyikében alkalmazható ellenanyagok termelhetők.

Egy további szempontból a találmány tárgyát képezi a fentebb említett peptidek összes analógja is. Szakember számára egyértelmű, hogy a találmány szerinti peptidek aminosav-szekvenciája a peptid antigénkötő tulajdonságainak

lényeges mértékű megváltoztatása nélkül módosítható pl. egy vagy több aminosav addíciója, deléciója vagy konzervatív vagy nem konzervatív szubsztitúciója által.

A "konzervatív szubsztitúció" kifejezés egy aminosav ugyanazon osztályba tartozó aminosavval történő helyettesítésére utal, ahol az osztályba sorolás az aminosav-oldalláncok közös fiziko-kémiai tulajdonságain és a természetben található homológ proteinekben pl. standard Dayhoff cseregyakoriság-mátrix ("frequency exchange matrix") vagy BLOSUM-mátrix alkalmazásával megállapított magas szubsztitúciós gyakoriságon alapul. Az aminosav-oldalláncok hat általános osztályba sorolhatók: I. osztály: (Cys); II. osztály: (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); III. osztály: (Asn, Asp, Gln, Glu); IV. osztály: (His, Arg, Lys); V. osztály: (Ile, Leu, Val, Met); VI. osztály: (Phe, Tyr, Trp). Például egy Asp egy másik III. osztályba sorolt aminosavval (Asn, Gln vagy Glu) történő helyettesítése konzervatív szubsztitúciónak számít. A "nem-konzervatív szubsztitúció" kifejezés egy adott osztályba sorolt aminosavnak egy másik osztályba tartozó aminosavval történő helyettesítését jelöli, pl. ilyen egy II. osztályba sorolt aminosav (Ala) egy III. osztályba sorolt aminosavval (Asp, Asn, Glu vagy Gln) történt helyettesítése.

A fentiekben (és a későbbiekben) az egyes aminosavak jelölésére alkalmazott betűk megfelelnek az IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission által javasolt egybetűs aminosav-jelöléseknek.

A találmány tárgyát képezik a fentiekben ismertetett peptidek azon analógjai is, amelyek a találmány szerinti monoklonális ellenanyagokhoz a 10-12. ábrákon bemutatott peptidekkel lényegében megegyező mértékben kötődnek. A kötődés mértékének megállapítására bármely, szakember számára ismert eljárás igénybevehető.

A találmány szerinti peptidek és azok analógjai kémiai úton is módosíthatók, a kémiai úton módosított peptidek és peptidanalógok is a találmány tárgyát képezik. A "kémiai úton módosított" kifejezés olyan proteinre utal, amely aminosavainak legalább egyike természetes úton, pl. feldolgozással vagy egyéb poszt-transzlációs beavatkozással, vagy szakember számára jól ismert kémiai módosító eljárások alkalmazásával módosítva lett. A számos ismert módosítási eljárás közül jellemzően, de nem kizárólag a következők igénybevételére kerülhet sor: acetilálás, acilálás, amidálás, ADP-riboszilálás, glikozilálás, GPI horgony kialakítás, folyékony vagy lipidszármazék kovalens kötése, metilálás, mirisztalálás, pegilálás, prenilálás, foszforilálás, ubikvitinálás stb.

A találmány alapját képező másik fontos felismerés, hogy a találmány szerinti monoklonális ellenanyagok különböző mértékben kötődnek egészséges és rosszindulatú megbetegedésben szenvedő páciensekből származó T-sejtekhez. Ez alapján a találmány tárgyát képezi egy vizsgált páciens rosszindulatú megbetegedésének nagy valószínűséggel történő kimutatására szolgáló vizsgálati eljárás, amely a következő lépésekből áll:

- (a) a páciensből testfolyadék-minta nyérése;
- (b) a mintának legalább egy találmány szerinti monoklonális ellenanyaggal történő érintkeztetése;
- (c) a monoklonális ellenanyag mintabeli T-sejtekhez történt kötődése mértékének megállapítása;
- (d) a (c) pontban megállapítottak összehasonlítása a találmány szerinti monoklonális ellenanyagok egészséges páciensből nyert T-sejtekhez történő kötődésének mértékével; a két kötődés mértéke közötti lényeges mértékű különbség arra utal, hogy a vizsgált páciens nagy valószínűséggel rosszindulatú megbetegedésben szenved.

A találmány szerinti megoldásban a vizsgálandó páciensből nyert minta bármely, kimutatható mennyiségű T-sejtet tartalmazó testfolyadék lehet. A testfolyadék-minta jellemzően vér- vagy nyirok. A találmány szerinti monoklonális ellenanyagok kinyert mintával történő érintkeztetését megelőzően előnyösen a mintabeli perifériás vérbeli mononuclearis sejteket ("peripheral blood mononuclear cells", PMBC) a szakember számára ismert eljárások bármelyikével, pl. "Ficoll Hypaque" sűrűségcentrifugálással szeparáljuk, majd ezeket a szeparált sejteket érintkeztetjük az adott ellenanyagokkal.

A "rosszindulatú megbetegedés" kifejezés szakember számára ismert bármely rosszindulatú megbetegedést és annak bármely szakaszát jelölheti, ideértve a még korai stádiumban lévő és klinikai tüneteket nem okozó rosszindulatú megbetegedéseket is. Ez a megjelölés előnyösen tömött dagantokra utal.

Az "egészséges páciens" kifejezés rosszindulatú megbetegedésben nem szenvedő egyénre utal, de utalhat több egyén esetében kapott átlagértékre, vagy több egyén testfolyadékainak összevonásával kapott minta esetében mért értékre is. A kötődés standard mértékének egészséges páciensek esetében történt megállapítását nem kell minden egyes vizsgálat esetén megismételni, az így kapott érték folyamatosan felhasználható. A találmány szerinti megoldással kapcsolatban kimutattuk, hogy egészséges páciensek CD3⁺ T-sejtjeinek kb. 25%-a kötődik a találmány szerinti ellenanyagokhoz.

A "nagy valószínűséggel" kifejezés arra utal, hogy a találmány szerinti vizsgálati eljárás egy kezdeti szűrővizsgálat, amely képes a feltételezhetően rosszindulatú megbetegedésben szenvedő páciensek azonosítására. Azt, hogy a találmány szerinti eljárással betegként azonosított páciens valóban rosszindulatú megbetegedésben szenved, később szakember számára ismert egyéb eljárásokkal kell igazolni.

A "kötődés mértéke" kifejezés az ellenanyagnak egy vizsgált páciens T-sejtjén található antigénhez történő kötődésének mértékére utal, amely az ellenanyag-kötődés mértékének megállapítására alkalmas bármely, szakember számára ismert eljárással, így pl. ELISA-val vagy western blot eljárással meghatározható. A kötődés mértékének meghatározásában bármely detektálórendszer, pl. kimutatást lehetővé tevő jelzőanyaghoz kötött anti-egér immunglobulin vagy annak fragmense igénybevehető. Kimutatást elősegítő jelzőanyag lehet pl. egy radioaktív csoport, egy fluoreszcens csoport, egy kimutatható terméket eredményező reakciót (pl.

színreakciót) katalizáló enzim, egy avidinnel kimutatható biotincsoport stb. A találmány egy előnyös megvalósítási módjában a találmány szerinti monoklonális ellenanyagok T-sejtekhez történő kötődése mértékének megállapítása kettős jelölés alkalmazásával történik, ahol a T-sejt elleni ellenanyag (pl. anti-CD3⁺ ellenanyag) egyfajta fluoreszcens jelzőanyaghoz, a találmány szerinti monoklonális ellenanyag pedig egy másik típusú fluoreszcens jelzőanyaghoz kötött. A kötődés mértékének megállapítása ezután fluoreszcein-aktivált sejtosztályozó berendezés ("fluorescein activated cell sorter", FACS) alkalmazásával történik. A kötődés mértékének megállapítása azon (anti-CD3⁺ ellenanyagokhoz kötődött) CD3⁺ T-sejtek arányának meghatározásán alapul, amelyek egyúttal a találmány szerinti monoklonális ellenanyagokhoz is kötődnek.

A találmány szerinti megoldásnak megfelelően kimutattuk, hogy a rosszindulatú megbetegedésben szenvedő páciensek vérmintáiban a CD3⁺ sejtek mennyisége hasonló az egészséges páciensektől származó vérminták CD3⁺ sejt tartalmához, így a monoklonális ellenanyagot és anti-CD3⁺ ellenanyagot egyaránt megkötő T-sejtek arányának megállapításakor rosszindulatú megbetegedésben szenvedő és egészséges páciensek esetében egyaránt érvényes az összes CD3⁺ T-sejtszámra történő normalizálás. Ugyanakkor a találmány szerinti monoklonális ellenanyagot is megkötő CD3⁺ T-sejtek (a továbbiakban "CD3⁺ mAb⁺ sejtek") százalékos aránya rosszindulatú megbetegedésben szenvedő páciensek esetében lényeges mértékben különbözik az egészséges páciensek vérében talál-

ható CD3⁺ mAb⁺ sejtek százalékos arányától. Rosszindulatú megbetegedésben szenvedő páciens esetében a megbetegedés típusától függően a CD3⁺ mAb⁺ sejtek százalékos aránya lényeges mértékben alacsonyabb vagy magasabb lehet, mint az ugyanezen sejtek egészséges páciensekben tapasztalható aránya.

A találmány szerinti monoklonális ellenanyag egy vizsgált páciensből nyert T-sejthez történő kötődésének mértékét egy egészséges páciensből nyert T-sejtekhez mutatott kötődéséhez képest *"lényeges mértékben különbözőnek"* ítéljük meg, ha a monoklonális ellenanyag kötődésének mértékében az itt említett kísérletes eljárások eredményeinek értékelésére alkalmazott, szakember számára ismert bármely statisztikai eljárással (pl. Student-féle t-próba) statisztikailag lényeges különbség tapasztalható.

A találmány szerinti megoldás nemcsak a nagy valószínűséggel valamilyen típusú rosszindulatú megbetegedéssel érintett egyének azonosítására alkalmas (ahol a betegségben szenvedő páciensben egy egészséges pácienshez képest a találmány szerinti monoklonális ellenanyagok eltérő mértékű T-sejt kötődése tapasztalható), hanem elősegítheti meghatározott rákos megbetegedések által érintett egyének azonosítását is, az alapján, hogy az egészséges páciens esetében meghatározotthoz képest alacsonyabb vagy magasabb mértékű kötődés megállapítására kerül sor.

A találmány szerinti monoklonális ellenanyagok egészséges páciensekből származó T-sejtekhez történő kötődése kb. 25%-on belül van, vagyis a CD3 T-sejt markert expresz-

száló (anti-CD3⁺ ellenanyag kötődése alapján azonosított) sejtek 25%-a a találmány szerinti monoklonális ellenanyagokat is megköti.

A találmány szerinti megoldásnak megfelelően kimutattuk, hogy prosztatarákos betegekből származó mintákban a találmány szerinti monoklonális ellenanyagokhoz kötődő CD3⁺ T-sejtek aránya kb. 50% körüli.

Kimutattuk továbbá, hogy a vastagbél- vagy emlőrákos páciensekből nyert mintákból származó Cd3⁺ T-sejtek esetében a találmány szerinti monoklonális ellenanyagokat is megkötő sejtek aránya kb. 7%, valamint kb. 10% volt.

Mindezek alapján a találmány szerinti megoldásnak megfelelően megállapítottuk, hogy a találmány szerinti monoklonális ellenanyagoknak a testfolyadék-mintában jelenlévő CD3⁺ sejtekhez történő kötődése mértékének meghatározásán alapuló egyszerű, egy alkalommal elvégezhető vizsgálati eljárással egy vizsgált páciens testfolyadékából nagy valószínűséggel kimutatható egy meghatározott daganattípus jelenléte. A találmány szerinti diagnosztikai vizsgálati eljárást annak egyszerűsége, vagyis az, hogy egy meghatározott rákos megbetegedésben szenvedő páciens azonosításához csupán egyfajta monoklonális ellenanyag alkalmazását igényli, rendkívül alkalmassá teszi a populáció széleskörű szkrínelésére.

Mindezek alapján egy további szempontból a találmány tárgyát egy vizsgált páciens egy meghatározott rosszindulatú megbetegedését nagy valószínűséggel kimutató vizsgálati eljárás képezi, amely a következő lépésekből áll:

- (a) a páciensből testfolyadék-minta nyérése;
- (b) a mintának a találmány szerinti monoklonális ellenanyagokkal történő érintkeztetése;
- (c) a monoklonális ellenanyagok mintabeli T-sejtekhez történt kötődése mértékének megállapítása;
- (d) a kötődés (c) pontban megállapított mértékének összehasonlítása a találmány szerinti monoklonális ellenanyagok egészséges páciensből nyert T-sejtekhez történő kötődésének mértékével, ahol a két kötődés mértéke közötti lényeges mértékű különbség arra utal, hogy a vizsgált páciens nagy valószínűséggel rosszindulatú megbetegedésben szenved; valamint ha a páciensből nyert T-sejtekhez történt kötődés mértéke alacsonyabb vagy magasabb a monoklonális ellenanyagok egészséges páciens T-sejtjeihez történő kötődésének mértékénél, az nagy valószínűséggel a vizsgált páciens meghatározott típusú rosszindulatú megbetegedésére utal.

Közelebbről, ha a találmány szerinti monoklonális ellenanyag kötődése lényegesen magasabb mértékű, mint egészséges páciensek esetében, akkor a vizsgált páciens nagy valószínűséggel prosztatarákban szenved.

Ha a találmány szerinti monoklonális ellenanyag kötődése lényegesen alacsonyabb mértékű, mint egészséges páciens esetében, akkor a vizsgált páciens nagy valószínűséggel vastagbél- vagy emlőrákban szenved.

A találmány diagnosztikai megvalósítási módjának megfelelően a találmány szerinti monoklonális ellenanyagokat tartalmazó készítmények felhasználhatók (általában) rossz-

indulatú megbetegedésben szenvedő páciensek azonosítására, vagy a páciens egy feltételezett meghatározott rosszindulatú megbetegedésének kimutatására. Egy további szempontból tehát a találmány tárgyát a fentebb bemutatott ellenanyagok legalább egyikének megfelelő monoklonális ellenanyagot alkalmas vivőanyaggal együtt tartalmazó diagnosztikai készítmény képezi. A hordozóanyag lehet oldható, pl. a szakember számára ismert élettani szempontból elfogadható pufferek bármelyike (pl. PBS), vagy szilárd fázisú, pl. ilyenek a latex gyöngyök.

A találmány tárgyát képezik továbbá pl. a találmány szerinti monoklonális ellenanyagokat alkalmazó és a fentebb említett diagnosztikai vizsgálati eljárások elvégzésére alkalmas diagnosztikai vizsgálati reagenskészletek is. A találmány egy megvalósítási módjában a diagnosztikai reagenskészlet rendszerint egy vagy több tárolóedényben a fentiekben említett monoklonális ellenanyagok közül legalább egyet, a monoklonális ellenanyag specifikus kötődési partnere (pl. a találmány szerinti antigén vagy analógja) konjugátumát, valamint kimutatható jelet produkáló jelzőanyagot és használati utasítást tartalmaz. A jelzőanyag a monoklonális ellenanyaghoz kötött, vagy alternatív módon, a monoklonális ellenanyaghoz specifikusan kötődő hordozómolekulához kapcsolt lehet. A vizsgált mintát a monoklonális ellenanyagok sejtekhez történő kötődését lehetővé tevő ideig inkubáljuk a diagnosztikai reagens készítménnyel.

Egy további szempontból a találmány tárgyát aktív összetevőként a találmány szerinti monoklonális ellenanyag-



ok közül egyet vagy többet tartalmazó gyógyászati készítmények képezik. A találmány tárgyát képezi továbbá a monoklonális ellenanyagok egy páciens különféle rosszindulatú megbetegedéseinek gyógykezelésére szolgáló gyógyászati készítmények előállítására történő alkalmazása is.

Egy további szempontból a találmány tárgyát egy kezelésre szoruló páciensnek a monoklonális ellenanyagok gyógyászati szempontból hatékony mennyiségének beadását magában foglaló, rosszindulatú megbetegedések gyógykezelésére alkalmas eljárás képezi. A gyógyászati szempontból hatékony mennyiség alkalmas a rosszindulatú megbetegedés tüneteinek enyhítésére, csökkentésére vagy teljes megszüntetésére.

A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti peptideket tartalmazó gyógyászati készítmények is. Ezek a készítmények például egy páciens aktív immunizálására, a T-sejtjeihez kötődő és benne immunválaszt kiváltó ellenanyagok képzésére vehetők igénybe.

Az alábbiakban részletesen bemutatjuk a találmány szerinti megoldást.

Az alábbiakban a csatolt ábrákra történő eseti hivatkozásokkal mutatjuk be a találmány főbb szempontjait. A leírásban és az ábrákon a "BAT ellenanyag" és a "találmány szerinti monoklonális ellenanyagok" kifejezéseket egymással azonos értelemben, felcserélhetően alkalmazzuk.

Az alábbiakban az ábrák rövid leírását közöljük.

Az 1. ábra a találmány szerinti monoklonális ellenanyag variábilis nehézlánc-régiójának DNS- és peptidszekvenciáját mutatja be.

A 2. ábra a találmány szerinti monoklonális ellenanyag variábilis kappa könnyűlánc-régiójának DNS- és peptidszekvenciáját mutatja be.

A 3. ábra a találmány szerinti ellenanyag ("BAT"-nak elnevezett) variábilis nehézlánc-régiója aminosav-szekvenciájának elemzését mutatja be. A "BAT" a BAT ellenanyag V_H régiójának aminosav-szekvenciájának, míg a "VMS2" a VMS2/VGK4 csíravonal-gén aminosav-szekvenciájának felel meg. Ahol a BAT-szekvencia és a csíravonal-szekvencia azonosak, a csíravonal szekvenciát egy pont (.) jelöli, a nem egyező csíravonal bázisokat feltüntettük az ábrán. A táblázatban és a következő oldalakon található szekvenciákon feltüntettük, hogy milyen gyakorisággal fordulnak elő bizonyos aminosavak egy meghatározott pozícióban az egér nehézlánc vegyes alcsoportban ("Mouse VH Misc.") és egy, az összes ismert egér V_H-szekvenciát tartalmazó nagyobb adatbázisban ("All mouse V_H") [Kabat és mtsai.: "Sequences of proteins of immunological interest" (1991)].

A 4. ábra a találmány szerinti ellenanyag (az ábrán "BAT"-nak nevezett) variábilis kappa könnyűlánc-régiója aminosav-szekvenciájának elemzését mutatja be. A "Mouse" jelzés a BAT ellenanyag K_κ régiója aminosav-szekvenciájának, míg a "Germ" jelzés a H4 csíravonal-gén aminosav-szekvenciájának felel meg. Ahol a BAT-szekvencia és a csíravonal-szekvencia azonosak, a csíravonal szekvenciát egy pont (.) jelöli, a nem egyező csíravonal bázisokat feltüntettük az ábrán. A táblázatban és a következő oldalakon található szekvenciákon feltüntettük, hogy milyen gyakoriság-

gal fordulnak elő bizonyos aminosavak egy meghatározott pozícióban a Kabat-féle egér nehézlánc VI. alcsoportban ("Mouse V_K VI") és egy, az összes ismert egér V_K -szekvenciát tartalmazó nagyobb adatbázisban ("All mouse V_K ")

Az 5. ábra a találmány szerinti kiméra ellenanyag variábilis kappa könnyűlánc-régiójának DNS- és peptidszekvenciáját ábrázolja.

A 6. ábra a találmány szerinti kiméra ellenanyag variábilis nehézlánc-régiójának DNS- és peptidszekvenciáját ábrázolja.

A 7. ábra a találmány szerinti kiméra ellenanyag kappa könnyűláncának expressziójára alkalmazott pKN 110 jelű emlős expressziós vektor vázlatos felépítését mutatja be.

A 8. ábra a találmány szerinti kiméra ellenanyag nehézláncának expressziójára alkalmazott pG1D 110 jelű emlős expressziós vektor vázlatos felépítését mutatja be.

A 9. ábra a találmány szerinti egéreredetű és $\gamma 1$ /kappa kiméra ellenanyag Daudi-sejtekhez történő kötődése jellegzetességeinek mérésére alkalmazott ELISA eredményeinek grafikus ábrázolására mutat be egy példát.

A 10. ábra a találmány szerinti 1. peptid aminosavszekvenciáját mutatja be.

A 11. ábra a találmány szerinti 2. peptid aminosavszekvenciáját mutatja be.

A 12. ábra a találmány szerinti 3. peptid aminosavszekvenciáját mutatja be.

A 13. ábra egészséges egyének vérmintáinak FACS-elemzése alapján a találmány szerinti monoklonális ellen-

anyagot (BAT jelzés) is megkötő CD3⁺ sejteknek az összes CD3⁺ sejt mennyiségéhez viszonyított százalékos arányát mutatja be vázlatosan.

A 14. ábra vastagbélrákos páciensek vérmintáinak FACS-elemzése alapján a találmány szerinti monoklonális ellenanyagot (BAT jelzés) is megkötő CD3⁺ sejteknek az összes CD3⁺ sejt mennyiségéhez viszonyított százalékos arányát mutatja be vázlatosan.

A 15. ábra emlőrákos páciensek vérmintáiban a találmány szerinti monoklonális ellenanyagot (BAT jelzés) is megkötő CD3⁺ sejteknek az összes CD3⁺ sejt mennyiségéhez viszonyított százalékos arányát mutatja be vázlatosan.

A 16. ábra prosztatatarákos páciensek vérmintáiban a találmány szerinti monoklonális ellenanyagot (BAT jelzés) is megkötő CD3⁺ sejteknek az összes CD3⁺ sejt mennyiségéhez viszonyított százalékos arányát mutatja be vázlatosan.

A 17. ábra egészséges egyének és emlőrákos, vastagbélrákos vagy prosztatatarákos páciensek esetében kapott értékeket összehasonlítva vázlatosan bemutatja a találmány szerinti monoklonális ellenanyagot (BAT jelzés) megkötő CD3⁺ sejtek átlagos százalékos arányát.

A 18. ábra prosztatatarákban, fül-, orr-, torokrákban ("ear, nose and throat carcinoma", ENT), emlőrákban szenvedő páciensekből, vagy Daudi-sejtrétegekből nyert T-sejtekből származó peptidek western blot elemzésének eredményéről készített felvétel. A találmány szerinti monoklonális ellenanyaggal inkubált lenyomat a prosztatatarákos páciensekből nyert T-sejtek esetében fokozott mennyiségű antigént jelez,

míg emlőrákos páciensekből nyert T-sejtek esetében az anti-gén mennyisége a kimutathatóság alatt van.

I. A monoklonális ellenanyag szekvenálása

(A) Rövidítések

Magzati borjúsavó (FCS); ribonukleinsav (RNS); hírvivő RNS (mRNS); dezoxiribonukleinsav (DNS); másolati DNS (cDNS); polimeráz-láncreakció (PCR); perc (min); másodperc (s); trisz-borát puffer (TBE).

(B) Anyagok

A tápközeg-összetevőket és minden egyéb szövettenyésztéshez alkalmazott anyagot a Life Technologies-től (UK) szereztünk be. Az RNS-izoláló reagenskészletet a Stratagene-től (USA), míg az első szál cDNS szintézishez alkalmazott reagenskészletet a Pharmacia-tól (UK) vásároltuk. A PCR-hez szükséges összetevők és berendezések (ideértve az "AmpliTa^q" DNS-polimerázt) forrása a Perkin Elmer (USA) volt. A "TA Cloning[®]" reagenskészletet az Invitrogen-től (USA) szereztük be. Az (UltraPure[™]) agarózt a Life Technologies-től (UK) vásároltuk. A "Thermo Sequences[™]" előkevert szekvenáló reagenskészlet és a "Vistra 725" típusú DNS-szekvenáló berendezés forrása az Amersham (UK) volt. Minden egyéb molekuláris biológiai terméket a New England Biolabs-tól (USA) szereztünk be.

(C) Kísérletes eljárások: az egérreredetű BAT ellenanyag variábilis régiója génjeinek PCR-klónozása és szekvenálása

Az egérreredetű BAT hibridóma sejtvonalat és a Daudi sejtvonalat sikeresen MRC-CC-re vittük, mindkét sejtvonalat

10% FCS-val, 100 egység/ml penicillinnel, 100 µg/ml sztreptomomicinnel, 2 mM L-glutaminnal, 1 mM nátrium-piruváttal és 12,5 egység/ml nisztatinnal kiegészített glutaminmentes RPMI-ben szuszpenzióban tenyésztettük.

Megközelítőleg 10^8 életképes BAT hibridóma sejtet nyertünk ki, majd ebből a sejtmennyiségből RNS izoláló reagenskészlet segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően összes RNS-t izoláltunk. A reagenskészlet guanidintiocianát és fenol-kloroform alapú egylépcsős kivonási eljárást alkalmazott [Chromczynski és Sacchi: Anal. Biochem 162, 156 (1987)]. Szintén a gyártó utasításainak megfelelően egy első szálú cDNS szintézis reagenskészlettel a BAT hibridóma RNS-ből a reagenskészletben található NotI-(dt)₁₈ láncindító alkalmazásával szimpla szálú DNS másolatot készítettünk. Mindegyik reakció 33 µl-es végső térfogatában megközelítőleg 5 µg összes RNS-t használtunk fel. A teljes reakciókeveréket ezután az RNS-cDNS duplex denaturálása és a reverz transzkriptáz inaktiválása érdekében 5 percre 90°C-ra melegítettük, majd jég között lehűtöttük. Az egérs eredetű variábilis nehézlánc-régió génjének (V_H-gén) és az egérs eredetű variábilis kappa könnyűlánc-régió génjének (V_K-gén) hibridóma sejtvonalból történő PCR-amplifikációjára Jones és Bendig eljárását alkalmaztuk [Jones és Bendig: Bio/Technology 9:8, (1987)]. Röviden, az egérs eredetű variábilis régió gének PCR-klónozására egyrészt két sorozat degenerált láncindítót alkalmaztunk, amelyek közül az egyiket úgy tervezték, hogy az egér nehézlánc-gének vezetőszekvenciájához (MHV1-12; 1. táblázat), a másikat úgy, hogy az

egéreredetű kappa könnyűlánc-gének vezetőszekvenciájához (MKV1-11; 2. táblázat) hibridizáljon, valamint emellett a megfelelő konstans régió génjének 5' végéhez hibridizáló láncindítókat vettünk igénybe.

Minden egyes degenerált láncindító és a neki megfelelő konstans régió láncindító alkalmazásával különálló PCR-eket végeztünk speciális PCR-szobában, a keresztszennyeződés lehetőségét minimálisra csökkentő speciális protokollok alkalmazása mellett. A templát cDNS amplifikálására minden esetben "AmpliTa^q" DNS-polimerázt alkalmaztunk. A PCR-csőveket ezután "Perkin Elmer 480 DNS thermal cycler" berendezésbe helyeztük, majd egy kezdeti, 94°C-on 1,5 percig végzett olvasztási fázist követően 94°C-on 1 percig, majd 72°C-on 1 percig 25 ciklust futtattunk. Az utolsó ciklus végeztével egy végső lánchosszabbító lépést végeztünk 72°C-on 10 percig, majd a reakcióelegyeket 4°C-ra hűtöttük. A hibridizálási (50°C) és lánchosszabbítási (72°C) lépések közötti 2,5 perces, hosszabb átállási időtől ("ramp time") eltekintve a ciklusok lépései között 30 másodperces átállási időt alkalmaztunk.

Annak kiderítésére, hogy melyik tartalmaz megfelelő méretű PCR-terméket, minden egyes PCR-ből 10 µl-t 1%-os agaróz/TBE gélen (pH = 8,8) futtattunk. A teljes hosszúságú variábilis régió géneket amplifikált PCR-eket önálló PCR-klónok nyerése és a PCR-eredetű hiba lehetőségének minimálisra csökkentése érdekében megismételtük. A megfelelő méretű PCR-termékek 1-6 µl-es egyenlő adagjait közvetlenül a "TA Cloning[®]" reagenskészletben található pCRII[™] vektorba

klónoztuk, majd a gyártó utasításinak megfelelően INA $\alpha F'$ kompetens sejtekbe transzformáltuk. A megfelelő méretű inszertet tartalmazó plazmidot magukban foglaló telepeket a pCRII 5' és pCRII 3' oligonukleotid láncindítókka (ld. 3. táblázat) végzett PCR-szkrínéléssel azonosítottuk [Güssow és Clackson: Nucleic Acids Res 17, 4000 (1989)].

Az azonosított, feltételezhetően pozitív klónok dupla szálú plazmid DNS-ét "Visstra" DNS-szekvenáló készülék és a "Thermo Sequenase™" előkevert szekvenáló reagenskészlet segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően szekvenáltuk.

1. példa

A BAT ellenanyag variábilis nehézlánc-régiójának klónozása és szekvenálása

Amint az a humanizálási eljárásoknál megszokott, szigorú PCR-klónozási és szekvenálási protokollt követtünk. Erre azért volt szükség, hogy minimálisra csökkentsük az egérreredetű V_H variábilis régió gének vad típusú szekvenciáiban a BAT hibridóma sejtvonalból származó hiba lehetőségét. A génszekvenciákat csak akkor fogadtuk el helyesnek, ha legalább két különböző, az egérreredetű BAT ellenanyagot expresszáló hibridóma sejtvonalból származó V_H -gén klón DNS-szekvencia adatai tökéletesen megegyeztek.

Három különböző, más-más összes RNS kivonásból és azt követő első szálú cDNS-szintézis reakcióból származó PCR-terméket PCR-klónoztunk és mindkét DNS szálát teljes egészében szekvenáltuk. Bár mind a 12 nehézlánc-láncindítót

(1. táblázat) megvizsgáltuk, csak az MHV9 jelű láncindító (az egéreredetű $\gamma 3$ nehézlánc-gén CH_1 doménjához hibridizáló MHCG3-mal együtt) PCR-amplifikált egy kb. 460 bp-os terméket, amelyet azután a pCRII™ klónozó vektorba TA-klónoztunk (nem közölt adatok).

A három (más-más első szál szintézis reakcióból és azt követő PCR reakcióból származó) PCR-termék mindegyikéből származó több egyedi klón DNS-szekvencia elemzésével meghatároztuk a BAT ellenanyag variábilis nehézlánc-régiójának szekvenciáját (ld. 1. ábra). A vizsgált három PCR-klón mindkét DNS-szállára vonatkoztatva igazoltuk a szekvencia azonosságát.

2. példa

A BAT ellenanyag variábilis kappa könnyűlánc-régiójának klónozása és szekvenálása

Az első szál szintézissel előállított szimpla szálú cDNS-templátot degenerált kappa könnyűlánc láncindítók sorozatával (ld. 2. táblázat) PCR-amplifikáltuk. Ez ugyanakkor egynél több degenerált láncindítóból származó PCR-termékek amplifikálódását eredményezte, ami arra utalt, hogy legalábbis a BAT hibridóma sejtvonalban egynél több variábilis régió gén transzkripciójára került sor.

Mindenekelőtt PCR-terméket eredményezett az (összes MKV-sorozatba tartozó láncindítóhoz hasonlóan a kappa könnyűlánc jelzőpeptid DNS-szekvenciájának 5' végéhez hibridizáló) MKV2 és az (egéreredetű kappa konstans régió génjének 5' végéhez hibridizáló) MKC láncindítók együttes al-

kalmazása. Korábbi, saját laboratóriumunkban szerzett tapasztalataink arra utaltak, hogy az MKV2 láncindító rendellenes mRNS-transzkriptumot PCR-amplifikál. Ez a MOPC21n jelzésű rendellenes pszeudogén jelen volt az eredeti MOPC-21 plasmacytoma sejtvonalból származó összes standard fúziós partnerben [Deyev, S. M. és mtsai.: *Genetica* 85, 45 (1991)]. A BAT hibridóma előállításához fúziós partnerként a MOPC-21 sejtvonalból származó NO-0 sejtvonalat használtuk. Ennek következtében nem meglepő tehát, hogy az MKV2 láncindító alkalmazásával PCR-terméket kaptunk. A termék elemzésével kimutattuk, hogy a funkció nélküli pszeudogénnek felel meg (nem közölt adatok).

Szokatlan módon egy további, az MKV7 láncindító és az MKC láncindító együttes alkalmazásakor rendszerint PCR-klónozásra kerülő, korábban a rokon NS-1 sejtvonal által szekretáltként azonosított pszeudogént [Hamlyn, P. H. és mtsai.: *Nucl. Acids Res.* 9, 4485 (1981)] nem lehetett kimutatni az eddig vizsgált PCR-termékek között. Mivel az NS-1 és NS-0 sejtvonalak egymással nagyon szoros rokonságban állnak, ezt kissé meglepőnek tartottuk. Ugyanakkor ez is rávilágított a BAT hibridóma sejtvonalban végbemenő kappa könnyűlánc-transzkripcióval kapcsolatos ismeretek tisztázatlanságára.

Az MKV5 és MKC jelű láncindítókkal a BAT hibridóma sejtvonalból egy további, végül a BAT ellenanyag V_k génjének bizonyult PCR-klónt amplifikáltunk. A megközelítőleg 450 bp-os termék $INV\alpha F'$ kompetens sejtekbe történt transzformálását követően a feltételezett pozitív transzformán-

sokat a PCR-szkríneléses vizsgálati eljárással azonosítottuk, majd DNS-szekvenáltuk.

Az MKV5-termék (más-más első szál szintézis reakcióból és azt követő PCR reakcióból származó) két egyedi klónjának DNS-szekvencia elemzésével meghatároztuk a BAT ellenanyag variábilis kappa könnyűlánc-régiójának szekvenciáját (ld. 2. ábra). A klónok mindkét DNS-szála esetében igazoltuk a szekvencia azonosságát.

3. példa

Az egérreredetű BAT ellenanyag variábilis régióinak szekvencia-elemzése

A BAT V_K és V_H régióinak aminosav-szekvenciáját összehasonlítottuk a Kabat-féle adatbázisban (ld. fentebb) meghatározott egérreredetű variábilis régió alcsoportok konszenzus szekvenciáival. Az elemzés alapján kiderült, hogy a BAT V_H régió legnagyobb mértékben az egérreredetű kappa VI. alcsoport konszenzus szekvenciájával egyezik meg. A BAT V_H régió hasonló elemzésével megállapítottuk, hogy az az egérreredetű "vegyes" jelzésű nehézlánc-alcsoport konszenzus szekvenciájához áll a legközelebb.

A fentiekben ismertetett BAT ellenanyag variábilis régiók szekvenciáinak egérreredetű csíravonal-szekvencia adatbázissal történt összevetése alapján megállapítottuk, hogy a BAT V_H -génhez a VMS/VGK4 jelzésű (3. ábra), a BAT V_K -génhez pedig a H4 jelzésű (4. ábra) csíravonal-gén áll legközelebb. Amint az a 3. ábrán látható, a BAT V_H -gén és a hozzá legközelebb álló csíravonal-gén közötti báziseltéré-

sek nem meglepő módon főként a CDR2-ben és a CDR3-ban helyezkedtek el. Csupán három keretbeli eltérés volt megfigyelhető, mindhárom az FR3-ban helyeződött. A BAT V_K -génnel (4. ábra) kapcsolatban szintén egyáltalán nem okozott meglepetést, hogy a báziseltérések túlnyomó része a CDR-ekben volt megfigyelhető. Az FR-ekben található négy eltérés mindegyike nagymértékben konzervatív változat volt, kivéve az FR3-ban a 72. pozícióban (Kabat szerinti számozás) található ciszteint. Ennek közvetlenül egy lényeges kanonikus aminosav (71. pozíció) melletti helyeződése arra utal, hogy a ciszteinnek kulcsfontosságú szerepe lehet az antigénkötésben. Ez a feltételezés azonban csak az Fv domén részletes modellezésével igazolható.

Mindazonáltal ezek az elemzések igazolták, hogy az egérereredetű V_H és V_K BAT variábilis régiók az egérereredetű variábilis régiók jellemző képviselői.

1. táblázat: a BAT variábilis nehézlánc-régió gén klónozása során alkalmazott PCR láncindítók

Megnevezés	Szekvencia (5' → 3')
MHV5 ^a (30 tagú)	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTTCCTT
MHV9 ^a (30 tagú)	ATGGATTGGGTGTGGACCTTGCTATTCCTG
	C A
MHCG3 ^b (21 tagú)	CAAGGGATAGACAGATGGGGC

^a Az MHV jelzés az egérereredetű variábilis nehézlánc-régió gének vezetőszekvenciáihoz hibridizáló láncindítót jelöl.

^b Az MHCG jelzés az egérreredetű konstans régió génjeihez hibridizáló láncindítókat jelöl.

2. táblázat: a BAT variábilis kappa könnyűlánc-régió gén klónozása során alkalmazott PCR láncindítók

Megnevezés	Szekvencia (5' → 3')
MKV2 ^a (30 tagú)	ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTG
	T T
MKV5 ^a (30 tagú)	ATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTC
	A T
MKV6 ^a (30 tagú)	ATGAGGTGCCCTGTTCAGTTCCTGGGG
	T TT C G C T A
MKV11 ^a (30 tagú)	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
MKC ^b (20 tagú)	ACTGGATGGTGGGAAGATGG

^a Az MKV jelzés az egérreredetű variábilis kappa könnyűlánc-régió gének vezetőszekvenciáihoz hibridizáló láncindítókat jelöl.

^b Az MKC jelzés az egérreredetű kappa konstans régió génjéhez hibridizáló láncindítót jelöl.

3. táblázat: a transzformált telepek PCR-szkrínelésére alkalmazott láncindítók

Megnevezés	Szekvencia (5' → 3')
pCRII 5' láncindító (18 tagú)	CTAGATGCATGCTCGAGC
pCRII 3' láncindító (21 tagú)	TACCGAGCTCGGATCCACTAG

II. A találmány szerinti kiméra ellenanyag előállítása és expressziója

(A) Rövidítések

Az alábbi leírásban a következő nem-SI egységeket és rövidítéseket alkalmaztuk.

Polimeráz-láncreakció (PCR); dezoxiribonukleinsav (DNS); másolati DNS (cDNS); variábilis kappa könnyűlánc-régió (V_K); variábilis nehézlánc-régió (V_H); perc (min); trisz-borát puffer (TBE); foszfát-pufferolt sóoldat (PBS); szobahőmérséklet (RT); szarvasmarha szérumalbumin (BSA); sósav (HCl); tormaperoxidáz (HRP); zsírszegény tej (LFM); óra (hr); százalék (%); O-feniléndiamin-dihidroklorid (OPD); többszörös klónozóhely (MCS).

(B) Anyagok

A tápközeg-összetevőket és minden egyéb szövettenyésztéshez alkalmazott anyagot a Life Technologies-től (UK) szereztük be. A PCR-hez szükséges összetevők és berendezések (ideértve az "AmpliTa^q" DNS-polimerázt) forrása a Perkin Elmer (USA) volt. A "TA Cloning[®]" reagenskészletet és az INV α F' kompetens sejteket azonban az Invitrogen-től (USA) szereztük be. A DH5 α kompetens sejteket és az (UltraPure[™]) agarózt a Life Technologies-től (UK) vásároltuk. A "Thermo Sequenase[™]" előkevert szekvenáló reagenskészlet és a "Vistra 725" típusú DNS-szekvenáló berendezés forrása az Amersham (UK) volt. Az ABI "Prism 310" génanalizátorral használt "Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit"-et a PE Applied Biosystems-től (UK) szereztük be. Minden egyéb molekuláris biológiai termék be-

szerezési forrása vagy a New England Biolabs (USA) vagy a Promega (USA) volt. A "NUNC-Immuno-plate MaxiSorp™" immuntálcákat a Life Technologies-től (UK) vásároltuk, míg a "Corning easy wash" ELISA tálcákat a Corning Laboratory Sciences Company-tól (USA) szereztük be. A kecske eredetű (Fc_γ fragmens specifikus) anti-humán IgG ellenanyagot, a kecske eredetű anti-humán kappa könnyűlánc/HRP-konjugátumot és az "AffinPure" kecske eredetű (Fc_γ fragmens specifikus) anti-humán IgG/HRP-konjugátumot a Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc-től vásároltuk. A "K-Blue" TMB szubsztrát és a "Red Stop" oldat beszerzési forrása a Neogen Inc. (USA) volt. Minden egyéb, ELISA-hoz szükséges terméket a Sigma-tól (UK) szereztünk be. A "Microplate Manager®" adat-elemző szoftvercsomagot a Bio-Rad-tól (UK) szereztük be. A mikrotérfogatú keveréses ultraszűrő cellát ("micro-volume stirred ultrafiltration cell") és a PM30 jelű szűrőmembránt az AMICON PLC-től (UK), míg az "Immunopure®" (G) IgG-tisztító reagenskészletet a Pierce PLC-től (UK) vásároltuk.

(C) Kísérletes eljárások

C1 Kiméra γ1/κ BAT ellenanyag előállítása

A korábban izolált egéreredetű variábilis kappa könnyűlánc-régió (V_K) génjét (1. ábra) és a variábilis nehézlánc-régió (V_H) génjét (2. ábra) 5'- és 3'- végeiken specifikusan tervezett PCR-láncindítók (1. táblázat) alkalmazásával módosítottuk, annak érdekében, hogy lehetővé tegyük a BAT variábilis régió génjeinek egy kiméra emberi-egér ellenanyag részeként emlőssejtekben történő expresszióját. Ennek érdekében mindegyik variábilis régió gén

esetében különálló PCR-eket végeztünk speciális PCR-szobában, a keresztszennyeződés lehetőségét minimálisra csökkentő speciális protokollok alkalmazása mellett. Templátként a BATV_H-pCR2.1 és a BATV_K-pCR2.1 plazmidokat alkalmaztuk, amplifikálásukra "AmpliTaq®" DNS-polimerázt vettünk igénybe. A BAT V_H-gén PCR-es módosítására a B8814 és B8815 jelű (4. táblázat) láncindítókat vettük igénybe, a BAT V_K-gén esetében ugyanezen célra a C0224 és C0225 jelű (4. táblázat) láncindítókat alkalmaztuk.

A PCR-reakcióelegyeken (94°C-on 3 percig végzett olvasztási fázist követően) 94°C-on 50 másodpercig, majd 72°C-on 1 perc 30 másodpercig 30 ciklust futtattunk. Az utolsó ciklus végeztével egy végső lánchosszabbító lépést végeztünk 72°C-on 10 percig, majd a reakcióelegyeket jég között lehűtöttük. Annak kiderítése érdekében, hogy melyik PCR reakcióelegy tartalmazta a megfelelő méretű PCR-terméket mindegyikből 5 µl-t 1,2%-os agaróz/TBE gélen (pH = 8,8) futtattunk.

A megfelelő méretű PCR-termékek 1-2 µl-es egyenlő adagjait közvetlenül a "TA Cloning®" reagenskészletben található pCR2.1™ vektorba klónoztuk, majd a gyártó utasításnak megfelelően INVαF' kompetens sejtekbe transzformáltuk. A megfelelő méretű inszertet tartalmazó plazmidot magukban foglaló telepeket a 1212 és 1233 jelű oligonukleotid láncindítók (5. táblázat) segítségével végzett PCR-szkríneléssel azonosítottuk (Güssow és Clackson, ld. fentebb). Az azonosított, dupla szálú plazmid DNS-t tartalmazó feltételezett pozitív klónokat "Vistra" DNS-szekvenáló berendezés-

sel és ABI "Prism 310" génanalizátorral szekvenáltuk. A "Thermo Sequenase™ előkevert szekvenáló reagenskészletet és a "Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit"-et a gyártó utasításainak megfelelően, a 1212 és 1233 jelű láncindítókkal (5. táblázat) alkalmaztuk.

A megfelelően adaptált BAT V_K- és V_H-géneket (5. valamint 6. ábra) kiméra könnyű és nehézláncok emlőssejtben történő expresszállása érdekében *Hind*III-*Bam*HI fragmensekként a pKN110 (7. ábra) és pG1D110 (8. ábra) expressziós vektorokba szubklónoztuk. A ligált expressziós vektorokat (vagyis a pKN110-BATV_K-t és a pG1D110-BATV_H-t) ezután DH5α kompetens sejtekbe transzformáltuk. A megfelelő felépítésű expressziós vektorokat tartalmazó pozitív klónokat végül restriktációs emésztést alkalmazó elemzéssel azonosítottuk.

C2 A kiméra γ_1/κ BAT ellenanyag vektor DNS COS-sejtekbe történő kotranszfektálása

Az emlős expressziós vektor COS-sejtekbe történő transzfektálására Kettleborough és mtsai. eljárását vettük igénybe. Röviden összefoglalva, a DNS-t (a pKN110-BATV_K jelű kappa könnyűlánc expressziós vektor és a pG1D110-BATV_H jelű nehézlánc expressziós vektor 10-10 µg-ját) 1×10^7 sejt/ml koncentrációjú PBS 0,70 ml-éhez adtuk, majd Bio-Rad "Gene Pulser" berendezéssel 1900 V és 25 µF kapacitás értékekkel pulzáltuk. Szobahőmérsékleten végzett 10 perces helyreállításukat követően az elektroporált sejteket 5% FCS-t tartalmazó DMEM 8 ml-éhez adtuk, majd 37°C-on 72 órán át 5%-os CO₂ légkörben inkubáltuk. A 72 órás inkubálás elteltével a tápközeget kinyertük, a sejttörmelék eltávolítása

érdekében centrifugáltuk, majd kiméra BAT ellenanyag termelés jelenléte szempontjából ELISA-val vizsgáltuk.

C3 Kiméra γ 1/k ellenanyag mennyiségi meghatározása ELISA-val

Egy 96 üregű "Nunc-Imuno Plate MaxiSorp™" immuntálca mindegyik üregét először PBS-ben hígított 0,4 ng/ μ l kecske eredetű anti-humán ($Fc\gamma$ -fragmens specifikus) IgG ellenanyag 100 μ l-es egyenlő adagjaival vontuk be, a lemezeket 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk, majd a bevonóoldatot a használat előtt eltávolítottuk. A vizsgált minták (a sejttörmelék eltávolítása érdekében centrifugált COS-sejttenyészet-felülúszók) 100 μ l/üreg adagjait és azok minta-enzim konjugátum pufferrel [0,1 M Tris-HCl (pH = 7,0), 0,1 M NaCl, 0,02 térfogat% TWEEN-20 és 0,2 vegyes% BSA] 1:2 arányban történt hígításait az immuntálcára jutattuk. Emellett standardként tisztított emberi γ 1/k ellenanyag (1000 ng/ μ l) 1:2 arányú sorozathígítását is az immuntálcára vittük. Az immuntálcát 37°C-on egy órán át inkubáltuk, majd üregenként 200 μ l mosópufferrel (PBS/0,1 térfogat% TWEEN-20) három alkalommal mostuk. Ezután minden üreghez minta-enzim konjugátum pufferben 5000-szeresre hígított kecske eredetű anti-humán kappa könnyűlánc/tormaperoxidáz konjugátum 100 μ l-ét adtuk, ezután az immuntálcát 37°C-on egy órán át inkubáltuk, majd a fenteik szerint ismét mostuk. Ezt követően "K-Blue" szubsztrát 150 μ l-es egyenlő adagjait jutattuk az üregekbe, majd az immuntálcát sötétben, szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltuk. A reakciót üregenként 50 μ l "Red Stop" hozzáadásával állítottuk le. Az optikai sűrű-

ség értékét Bio-Rad 3550 jelű mikrotitertálca-leolvasó berendezés és "Microplate Manager®" szoftvercsomag segítségével, 655 nm-en állapítottuk meg.

C4 A kiméra BAT ellenanyag tisztítása

A kiméra γ 1/k ellenanyagot COS-sejttenyészet felülúszójából, két lépésben tisztítottuk ki. Először a nyers, nem tisztított felülúszó mennyiségének csökkentése érdekében egy mikrotérfogatú keveréses ultraszűrő cellát és PM30 jelű szűrőmembránt alkalmaztunk, a gyártó utasításainak megfelelően. Ezután a kiméra BAT ellenanyag koncentrált felülúszóból történő affinitás-tisztítására "Immunopure®" (G) IgG tisztító reagenskészletet alkalmaztunk, szintén a gyártó előírásainak megfelelően.

C5 Daudi-sejt ELISA

A sejt ELISA-t egy szintén dr. Hardy (Felsenstein Medical Research Center, Rabin Medical Center, Beilinson Campus, Petach Tikva, 49100 Izrael) által készített eredeti törzstenyészetből továbbtenyésztett Daudi-sejtek alkalmazásával végeztük. A vizsgálati eljárásen kismértékű módosításokat végeztünk attól függően, hogy az egér- vagy a egér/-emberi kiméra BAT ellenanyagot vizsgáltuk. Az egér eredetű BAT ellenanyag kötődési affinitásának vizsgálatához másodlagos ellenanyagként 1:15000 hígítású kecske eredetű anti-egér (Fab specifikus) IgG/HRP konjugátumot alkalmaztunk. Ezzel szemben a kiméra BAT ellenanyag affinitásának vizsgálatára 1000-szeres hígítású "AffiniPure" kecske eredetű anti-humán (Fc γ -fragmens specifikus) IgG/HRP konjugátumot vettünk igénybe.

Az átolvásuk után két nappal a Daudi-sejteket 10^5 sejt/üreg mennyiségben 96 üregű "Corning easy wash" ELISA tálcára juttattuk, majd a tálcát száraz inkubátorban 37°C -on egy éjszakán át inkubáltuk. A következő napon $200\ \mu\text{l}$ rehidrááló puffert (10% FCS-t és 0,05% azidot tartalmazó PBS-t) adtunk az üregekhez legalább 1 óra időtartamra. Ezután a rehidrááló puffert elöntöttük, majd a tisztított BAT ellenanyag különböző 1:2 arányú sorozathígításainak $50\ \mu\text{l}$ -ét adtuk az üregekhez. A tálcát ezután ismételten (4°C -on) egy éjszakán át inkubáltuk, üregenként $200\ \mu\text{l}$ 5% LFM-et tartalmazó PBS-sel mostuk és száradni hagytuk. Ezután minden üreghez a HRP-konjugált másodlagos ellenanyag $50\ \mu\text{l}$ -ét adtuk, majd hat különböző mosást végeztünk (egy mosást 5% LFM-et tartalmazó PBS-sel, három mosást 0,05% TWEEN-20-at is tartalmazó ugyanezen pufferrel, majd két mosást a PBS/LFM-pufferrel). Ezután az üregekbe 0,05 M citrátpufferben ($\text{pH} = 5,0$) lévő 0,4 mg/ml OPD szubsztrát és 60 mg/ml hidrogén-peroxid $200\ \mu\text{l}$ -ét juttattuk, majd az ELISA-tálcát a színreakció kialakulásáig (általában kb. 30 percig) sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A reakciót végül üregenként $50\ \mu\text{l}$ 2.5 M kénsav hozzáadásával állítottuk le, majd az optikai sűrűség értékét Bio-Rad 3550 jelű mikrotitertálca-leolvasó berendezés és "Microplate Manager®" szoftvercsomag segítségével, 490 nm-en állapítottuk meg.

Eredmények

4. példa

A kiméra μ /K BAT ellenanyag előállítás

Mint minden vizsgálatnál, itt is szigorú PCR-klónozási és szekvenálási protokollt követtünk. Erre azért volt szükség, hogy minimálisra csökkentsük az egéreredetű variábilis régió génnek vad típusú szekvenciáiban a PCR-es módosítási lépés során kialakuló hiba esélyét. Az egéreredetű BAT V_K -gént (2. ábra) a C0224 és C0225 jelű (1. táblázat) láncindítók alkalmazásával PCR-rel módosítva egy 418 bp-os csíkot kaptunk (nem közölt adatok). Ezt a PCR-terméket a pCR2.1 plazmidba ligáltuk, majd INV α F' kompetens sejtekbe transzformáltuk. Hasonlóképpen, az egéreredetű BAT V_H -gént (1. ábra) a B8814 és B8815 jelű (1. táblázat) láncindítók alkalmazásával PCR-rel módosítva egy 436 bp-os csíkot kaptunk (nem közölt adatok). Ezt a PCR-terméket is a pCR2.1 plazmidba ligáltuk, majd INV α F' kompetens sejtekbe transzformáltuk.

A feltételezett pozitív transzformánsokat az ABI "Prism 310" jelű génanalizátorral végzett ds-DNS-szekvenálásukat megelőzően PCR-szkríneléses vizsgálati eljárás segítségével azonosítottuk (nem közölt adatok). A 3. és 4. ábrák a kiméra BAT V_K -gén és BAT V_H -gén DNS-szekvencia elemzésnek eredményét mutatják be. Az elemzést sikeres mutációjuk igazolása és a PCR okozta esetleges génhibák kimutatása érdekében végeztük el. Mindegyik variábilis régió gén esetében csak egy PCR-t végeztünk, és reakcióként két klón teljes DNS-szekvenálására került sor.

Mindazonáltal ez elegendőnek bizonyult a megfelelően módosított DNS-szekvenciát tartalmazó módosított variábilis régió gén legalább egy klónjának izolálásához.

A mutáns V_H - és V_K -géneket *HindIII*-*BamHI* fragmensekként a megfelelő expressziós vektorokba szubklónozva a pKN110-BATV_K-t (7,88 kb) és a pG1D110-BATV_H-t (7,55 kb) kaptuk. Az így előállított expressziós vektorok azonosságát restriktációs enzim elemzéssel igazoltuk (nem közölt adatok). COS-sejtekbe kotranszfectálva ezek a vektorok a kiméra BAT ellenanyag γ_1/K változatának átmeneti expresszióját teszik lehetővé.

Mindezek mellett a BAT ellenanyag humanizálási projekt kiegészítéseként elvégeztük a BAT V_H -gén *HindIII*-*BamHI* fragmensként a pG3D110 és a pG4D1100 nehézlánc-expressziós vektorokba történő szubklónozását is. Ezek a vektorok meg-egyeznek a pG1110-zel, azzal a különbséggel, hogy bennük a γ_1 emberi konstans régió gének cDNS másolatát (a pG3D110 esetében) a γ_3 konstans régió gének cDNS-e vagy a (a pG3110 esetében) a γ_4 konstans régió gének cDNS-e helyettesíti. E vektorok (vagyis a pG3D110-BATV_K, előállítása a kiméra BAT ellenanyag γ_3/K és γ_4/K változatai COS sejtekben.

5. példa

A kiméra γ_1/K BAT ellenanyag átmeneti expressziója

A pKN110-BATV_K és a pG1D110-BATV_H vektorokat ismételt átmeneti expressziós kísérletek sorozatával COS-sejtekbe kotranszfectáltuk. 72 órás expressziót követően a kotranszfectált COS-sejtek tenyészetének felulúszójában γ_1/K ELISA-

val kimutatható volt az egér/ember kiméra $\gamma 1/\kappa$ BAT ellenanyag jelenléte. Az említett eljárás szerint a kiméra $\gamma 1/\kappa$ BAT ellenanyag tápközegbeli átlagos koncentrációja 509 ± 272 ng/ml volt.

Érdekes módon, a kiméra BAT ellenanyag $\gamma 3/\kappa$ és $\gamma 4/\kappa$ változatainak COS-sejtekben történt expressziója lényegesen nagyobb mennyiségű ellenanyag képződését eredményezte. Közlebbbről, a pG3D110-BATV_H és a pKN110-BATV_K COS-sejtekbe történt transzfekcióját követően a tápfolyadék felülúszójának (a 4.3 szakaszban leírt ELISA eljárást és standardként emberi IgG3/kappa ellenanyagot alkalmazó) első vizsgálata alapján a kiméra $\gamma 3/\kappa$ BAT ellenanyag $6,7 \mu\text{g/ml}$ mennyiségben expresszáldott. Mindezekén túl a pG4D110-BATV_H és a pKN110-BATV_K COS-sejtekbeli expressziója ugyanazon ELISA-vizsgálat alapján (standardként emberi IgG4/kappa ellenanyagot alkalmazva) $8,2 \mu\text{g/ml}$ kiméra $\gamma 4/\kappa$ BAT ellenanyag expresszióját eredményezte.

6. példa

A kiméra $\gamma 1/\kappa$ BAT ellenanyag tisztítása

Kotranszfekciókként kb. 8 ml felülúszót tudtunk ki-nyerni, annyi a transzfekciót végeztünk, míg 200 ml COS tápfolyadék felülúszó állt rendelkezésünkre. A felülúszó térfogatát ezután PM30 jelű szűrőmembránnal ellátott mikro-térfogatú keveréses ultraszűrő cellán történt átbocsátásával 15 ml-re csökkentettük. A szűrőmembrán molekulasúly küszöbértéke 30 kDa volt.

Az "Immunopure®" (G) IgG tisztító reagenskészlet lényegében rögzített G proteint tartalmazó 2 ml-es oszlopból állt. Az ellenanyagot 6 ml eluálópufferrel eluáltuk az oszlopról, az eluátumot 1 ml-es frakciókban gyűjtöttük. E frakciók γ 1/k BAT ellenanyag koncentrációját a C3 szakaszban leírt ELISA-val határoztuk meg. Ezzel az elemzéssel megállapítottuk, hogy a kiméra ellenanyag a harmadik (42,05 μ g/ml) és negyedik (20,05 μ g/ml) frakciókban volt jelen, ami összesen 62,1 μ g kiméra γ 1/k BAT ellenanyag kinyerésének felel meg. A kinyert anyagot a további vizsgálatok céljából a Curetech-hez történt szállításáig -20°C-on tároltuk.

7. példa

A kiméra γ 1/k BAT ellenanyag Daudi-sejtekhez történő kötődésének vizsgálata

A Daudi-sejt ELISA alkalmazásával egyértelműen kimutattuk, hogy a tisztított kiméra γ 1/k BAT ellenanyag Daudi-sejtekhez kötődik. A 9. ábra egy ilyen kísérlet eredményének tipikus példáját mutatja be. Ugyanazon ELISA vizsgálattal azonban a hasonló koncentrációban lévő egéreredetű BAT ellenanyag kötődését nem lehetett ennyire egyértelműen megítélni, az a kiméra ellenanyagénál alacsonyabbnak mutatkozott. Mivel azonban az ellenanyagok Daudi-sejtekhez történő kötődésének kimutatására alkalmazott konjugált másodlagos ellenanyag mindegyik ellenanyag-szerkezet esetében eltérő volt, a két változat kötődése közvetlenül nem összehasonlítható.

4. táblázat: az egéreredetű BAT ellenanyag variábilis kappa könnyűlánc és nehézlánc régió génjei kiméra $\gamma 1/\kappa$ BAT ellenanyag részeként emlőssejtekben történő expressziója érdekében végzett PCR-alapú módosítására alkalmazott lánc-indítók

Megnevezés	Szekvencia (5' → 3')
C0225 (42 tagú)	CCCAAGCTTGCCGCCACCATGGATTTTCAGG TGCAGATTATC
C0224 (39 tagú)	CGCGGATCCACTCACGTTTTATTTCCTCAACTT TGTCCCCG
B8815 (40 tagú)	GGATCCACTCACCTGAGGAGACGGTGACTGA GGTTCCTTG
B8814 (42 tagú)	AAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGGGTGTGGA CCTTGCTATTC

5. táblázat: a BAT ellenanyag variábilis régió PCR-módosított génjeinek DNS-szekvenálására és a transzformált telepek PCR-szkrínelésére alkalmazott láncindítók

Megnevezés	Szekvencia (5' → 3')
Hu $\gamma 1$ (17 tagú)	TTGGAGGAGGGTGCCAG
HCMVi.3s (28 tagú)	GTCACCGTCCTTGACACGCGTCTCGGGA
FOR (18 tagú)	TGTAAAACGACGGCCAGT
REV (18 tagú)	GAAACAGCTATGACCATG
B6990 (27 tagú)	CAGCATATGTTGACTCTCCACTGTCCG
B6991 (27 tagú)	GTCAACATATGCTGAAGAGTTCAAGGG
B8809 (18 tagú)	TGCCAGGTCAAGTGTAAG
B8810 (18 tagú)	AAGCCAGGTTGGATGTCC

III. A találmány szerinti monoklonális ellenanyagok által megkötött Daudi B-sejtes lymphoblastoid sejt vonal antigénből származó három peptid aminosav-szekvenciája

A Daudi B lymphoblastoid sejtek találmány szerinti monoklonális ellenanyagok által megkötött antigénhatású epitópjában található három peptid szekvenálását végeztük el. Szekvenciájukat a 10., 11. és 12. ábrák tartalmazzák.

A nem-redundáns génbank adatbázisban és az EST-részlegben (2. verziószámú) TBLAST algoritmus ("EXPECT" = 10, BLOSUM 62 mátrix) alkalmazásával a három peptidre irányuló keresés negatív eredményt hozott.

Mivel ezek a peptidek kisméretűek, a lekérdezés sztringensségét csökkentve magasabb "EXPECT" értékkel ismételt keresést végeztünk. Kikapcsoltuk az alacsony komplexitás szűrőt is, ami a "blast" jelentésből kiszűri a (pl. prolingazdag régiók vagy poli-A farkak okozta) potenciális zavaró egyezéseket és csak a párosított elrendezésük specifikitását tükröző "blast" statisztikával rendelkező régiókat hagyja benne. A találmány szerinti három peptid esetében még a génbank adatbázisban és az EST-részlegben végzett nagyon alacsony sztringensségű keresés is negatív eredményű volt.

A fenti eredmények alapján az említett peptidek feltehetően új peptideknek tekinthetők.

IV. Páciensek rosszindulatú megbetegedéseinek diagnó- zisa a találmány szerinti monoklonális ellenanyag alkalma- zásával

A vizsgált egyénekből származó perifériás vérbeli limfocitákat az anti-CD3 ellenanyaggal és a találmány szerinti ellenanyagok egyikével együttesen jelöltük. Megállapítottuk a találmány szerinti ellenanyaghoz kötődő CD3⁺ sejtek százalékos arányát. A találmány szerinti megoldásnak megfelelően kimutattuk, hogy a rosszindulatú megbetegedésben szenvedő páciensekben a CD3⁺ mAb⁺ sejtek száma eltér ugyanezen sejtek egészséges egyénekből nyert vérmintákbeli mennyiségétől. Az a tény, hogy rosszindulatú megbetegedésben szenvedő páciensek esetében lényeges mértékű különbség tapasztalható a CD3⁺ sejtek arányában, ami az egészséges egyénekből nyert CD3⁺ sejtekénél magasabb vagy alacsonyabb, nagy valószínűséggel lehetővé teszi annak megállapítását, hogy egy egyén rosszindulatú megbetegedésben szenved-e, és ha igen, milyen típusú rosszindulatú megbetegedése van.

Jellemzően, egészséges egyének vagy rákos betegek 20 ml-es vérmintáiból "Ficoll-Hypaque" sűrűségcentrifugálással perifériás vér eredetű limfocitákat nyertünk. A sejteket mostuk, majd 0,5% BSA-t és 0,05% savat tartalmazó PBS-ben szuszpendáltuk. A $0,5 \times 10^6$ számú sejtet tartalmazó minták FACS-elemzését végeztük el. Első lépésként a sejteket a találmány szerinti monoklonális ellenanyag telített mennyiségével 0°C-on 45 percig, majd FITC-konjugált anti-egér monoklonális ellenanyaggal jég között, 30 percig inkubáltuk. Két mosást, majd 1200 fordulat/perces centrifugálást

követően a sejteket PE ellenanyaggal konjugált anti-humán CD3-mal jég között 30 percig inkubáltuk. Ezt követően a sejteket két alkalommal mostuk, majd a mintát FACS-leolvasóval (Becton-Dickinson) vizsgáltuk. Az eredményeket a 13-17- ábrák tartalmazzák.

Amint az a 13. és 17. ábrákon látható, az egészséges egyénekből nyert vérmintákban a $CD3^+$ BAT^+ sejtek (összes $CD3^+$ sejthez viszonyított) aránya 25% körüli. A 14. ábrán bemutatottak szerint a vastagbélrákos páciensekből nyert vérmintákban az egészséges egyénekéhez viszonyítva lényegesen alacsonyabb, 7% körüli a $CD3^+$ BAT^+ sejtek aránya. Hasonlóképpen, az emlőrákos páciensekből nyert vérmintákban a $CD3^+$ BAT^+ sejtek aránya 10% körülinek adódott (15. ábra). Ezek az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a vastagbél- és az emlőrák kimutatható az alapján, hogy esetükben a $CD3^+$ BAT^+ sejtek aránya alacsonyabb az egészséges egyénekben megfigyelhetőnél.

A prosztatatarákos betegek vérmintáiban az egészséges egyénekéhez képest lényegesen magasabb, 50% körüli a $CD3^+$ BAT^+ sejtek aránya (16. ábra). Ezek az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a prosztatatarák kimutatható az alapján, hogy esetében a $CD3^+$ BAT^+ sejtek aránya magasabb az egészséges egyénekben megfigyelhetőnél. Amint a 18. ábrán látható, a prosztatatarákos betegekből nyert T-sejteken a találmány szerinti monoklonális ellenanyag által megkötött antigén mennyisége nagyon magas, míg az emlőrákos páciensekből nyert T-sejtekből nem mutatható ki.

A fenti eredmények alapján a találmány szerinti monoklonális ellenanyagok igénybevehetők egy meghatározott rosszindulatú megbetegedésben szenvedő páciens azonosítására. Ennek megfelelően, ha egy vizsgált egyénből nyert vérmintában a találmány szerinti ellenanyagok $CD3^+$ sejtekhez történő kötődése megfelelő mértékben magas arányú (50% körüli), nagyon nagy a valószínűsége, hogy az illető prosztatákban szenved. Ezzel szemben, ha a mintabeli $CD3^+$ sejtek aránya egészséges egyénekéhez képest megfelelő mértékben alacsony (7% és 10% körüli), akkor a vizsgált beteg nagy valószínűséggel emlő- vagy vastagbélrákban szenved. Ha a vizsgált beteg történetesen hímnemű, akkor nyilvánvalóan nagy valószínűséggel vastagbélrákban szenved.

A fenti példák nem jelentik a találmány hatókörének korlátozását. A találmány szerinti monoklonális ellenanyagokhoz kötődő $CD3^+$ sejtek aránya és egyéb rosszindulatú megbetegedések közötti további összefüggések is a találmány tárgyát képezik.

SZEKVENCIALISTA

<210> 1

<211> 462

<212> DNS

<213> Humanus

<220>

<400> 1

```
tactagtcga catggcttgg gtgtggacct tgctattcct gatggcagct gcccaaagta 60
tccaagcaca gatccagttg gtgcagtctg gacctgagtt gaagaagcct ggagagacag 120
tcaagatctc ctgcaaggct tctggatata ctttcacaaa ctatggaatg aactgggtga 180
agcaggctcc aggaaagggt ttaaagtgga tgggctggat aaacaccgac agtggagagt 240
caacatatgc tgaagagttc aagggaagggt ttgccttctc ttgggaaacc tctgccaaca 300
ctgcctattt gcagatcaac aacctcaaca atgaggacac gcctacatat ttctgtgtga 360
gagtcggcta cgatgctttg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctcctcaa 420
ctacaacaac agccccatct gtctatccct tcccgggttc ca 462
```

<210> 2

<211> 443

<212> DNS

<213> Humanus

<220>

<400> 2

```
actagtcgac atggatttac aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt 60
cataatgtcc agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc 120
aggggagaag gtcaccataa cctgcagtgc cagggtcaagt gtaagttaca tgcactgggt 180
```



ccagcagaag ccaggcactt ctcccaaact ctggatttat aggacatcca acctggcttc 240
tggagtcctt gctcgcttca gtggcagtgg atctgggacc tcttactgtc tcacaatcag 300
ccgaatggag gctgaagatg ctgccactta ttactgccag caaaggagta gtttccact 360
cacgttcggc tcggggacaa agttggaaat aaaacgggct gatgctgcac caactgtatc 420
catcttccca ccatccaaga tct 443

<210> 3

<211> 412

<212> DNS

<213> Humanus

<220>

<400> 3

aagcttgccg ccaccatgga ttacaggtg cagattatca gcttctgct aatcagtgcc 60
tcagtcataa tgtccagagg acaaattgtt ctcccccagt ctccagcaat catgtctgca 120
tctccagggg agaaggtcac cataacctgc agtgccaggt caagtgtgta ttacatgcac 180
tggttccagc agaagccagg cacttctccc aaactctgga tttataggac atccaacctg 240
gcttctggag tccctgctcg cttcagtggc agtggatctg ggacctctta ctgtctcaca 300
atcagccgaa tggaggctga agatgctgcc acttattact gccagcaaag gagtagtttc 360
ccactcacgt tcggctcggg gacaaagttg gaaataaaac gtgagtggat cc 412

<210> 4

<211> 436

<212> DNS

<213> Humanus

<220>

<400> 4

aagcttgccg ccaccatggc ttgggtgtgg accttgctat tcctgatggc agctgccc aa 60
agtatccaag cacagatcca gttggtgcag tctggacctg agttgaagaa gcctggagag 120
acagtcaaga tctcctgcaa ggcttctgga tatactttca caaactatgg aatgaactgg 180
gtgaagcagg ctccaggaaa gggttttaaag tggatgggct ggataaacac cgacagtgga 240
gagtcaacat atgctgaaga gttcaaggga cggtttgctt tctctttgga aacctctgcc 300
aacactgcct atttgcagat caacaacctc aacaatgagg acacggctac atatttctgt 360
gtgagagtcg gctacgatgc tttggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 420
tcaggtgagt ggatcc 436

<210> 5

<211> 21

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 5

caagggatag acagatgggg c 21

<210> 6

<211> 30

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 6

atggactcca ggctcaattt agttttcctt 30

<210> 7

<211> 30

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 7

atggmttggg tgtggamctt gctattcctg

30

<210> 8

<211> 20

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 8

actggatggt gggaagatgg

20

<210> 9

<211> 28

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 9

atggaagccc cagctcagct tctcttcc

28

<210> 10

<211> 30

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 10

atggagwcag acacactcct gytatgggtg

30

51426

<210> 11

<211> 30

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 11

atggattttwc aggtgcagat twtcagcttc

30

<210> 12

<211> 27

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 12

atgaggtkcy ytgysagyt yctgrgg

27

<210> 13

<211> 18

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 13

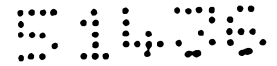
ctagatgcat gctcgagc

18

<210> 14

<211> 21

<212> DNS



<213> Humanus

<400> 14

taccgagctc ggatccacta g

21

<210> 15

<211> 42

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 15

aagcttgccg ccaccatggc ttgggtgtgg accttgctat tc

42

<210> 16

<211> 40

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 16

ggatccactc acctgaggag acggtgactg aggttccttg

40

<210> 17

<211> 39

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 17

cgcggatcca ctacgtttt atttccaact ttgtccccg

39

<210> 18

<211> 42

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 18

cccaagcttg ccgccaccat ggattttcag gtgcagatta tc

42

<210> 19

<211> 27

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 19

cagcatatgt tgactctcca ctgtcgg

27

<210> 20

<211> 27

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 20

gtcaacatat gctgaagagt tcaaggg

27

<210> 21

<211> 18

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 21

tgccagggtca agtgtaag

18

<210> 22

<211> 18

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 22

aagccagggtt ggatgtcc

18

<210> 23

<211> 18

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 23

tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 24

<211> 28

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 24

gtcacggtcc ttgacacgcg tctcggga

28

<210> 25

<211> 17

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 25

ttggaggagg gtgccag

17

<210> 26

<211> 18

<212> DNS

<213> Humanus

<400> 26

gaaacagcta tgaccatg

18

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Variábilis régiót tartalmazó monoklonális ellenanyag, amely az alábbiak bármelyike:

(a) az 1. ábrának megfelelő aminosav-szekvenciát tartalmazó variábilis nehézlánc-régiót magában foglaló monoklonális ellenanyag;

(b) a 2. ábrának megfelelő aminosav-szekvenciát tartalmazó variábilis kappa könnyűlánc-régiót magában foglaló monoklonális ellenanyag;

(c) az 1. ábrának megfelelő aminosav-szekvenciát tartalmazó variábilis nehézlánc-régiót és a 2. ábrának megfelelő aminosav-szekvenciát tartalmazó variábilis kappa könnyűlánc-régiót magában foglaló monoklonális ellenanyag;

(d) az 1. ábrának megfelelő aminosav-szekvenciával legalább 70%-ban azonos variábilis nehézlánc-régiót magában foglaló monoklonális ellenanyag; vagy

(e) a 2. ábrának megfelelő aminosav-szekvenciával legalább 70%-ban azonos variábilis kappa könnyűlánc-régiót magában foglaló monoklonális ellenanyag.

2. Az 1. igénypont szerinti monoklonális ellenanyag, amely az 1. ábra szerinti aminosav-szekvenciát magában foglaló variábilis nehézlánc-régiót tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti monoklonális ellenanyag, amely a 2. ábra szerinti aminosav-szekvenciát magában foglaló variábilis kappa könnyűlánc-régiót tartalmaz.

4. Az 1. igénypont szerinti monoklonális ellenanyag, amely az 1. ábra szerinti aminosav-szekvenciát magában fog-



laló variábilis nehézlánc-régiót, valamint a 2. ábra szerinti aminosav-szekvenciát magában foglaló variábilis kappa könnyűlánc-régiót tartalmaz.

5. Az 1. igénypont szerinti monoklonális ellenanyag, amely az 1. ábra szerinti aminosav-szekvenciával legalább 70%-ban azonos variábilis nehézlánc-régiót tartalmaz.

6. Az 1. igénypont szerinti monoklonális ellenanyag, amely a 2. ábra szerinti aminosav-szekvenciával legalább 70%-ban azonos variábilis könnyűlánc-régiót tartalmaz.

7. Ellenanyag, amely kötődik az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti monoklonális ellenanyag által specifikusan megkötött antigénhez.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti ellenanyag, amely ember/egér kiméra ellenanyag.

9. Nukleinsav-szekvencia, amely az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti monoklonális ellenanyag aminosav-szekvenciáját kódolja.

10. Expressziós vektor, amely 9. igénypont szerinti nukleinsav-szekvenciát tartalmaz.

11. A 10. igénypont szerinti expressziós vektor, amely a pKN110 jelzésű plazmidnak felel meg.

12. A 10. igénypont szerinti expressziós vektor, amely a pG1D110 jelzésű plazmidnak felel meg.

13. A 10-12. igénypontok bármelyike szerinti expressziós vektorral transzfektált sejt.

14. Az 1-8. igénypont szerinti monoklonális ellenanyagok bármelyikét termelő hibridóma sejtvonal.

15. Vizsgálati eljárás egy vizsgált egyén rosszindulatú megbetegedésének nagy valószínűséggel történő kimutatására, *azzal jellemezve, hogy*

(a) az egyéntől testfolyadék-mintát nyerünk;

(b) a mintát az 1-8. igénypontok szerinti monoklonális ellenanyagok közül legalább eggyel érintkeztetjük;

(c) meghatározzuk a monoklonális ellenanyagok mintabeli T-sejtekhez történő kötődésének mértékét;

(d) összehasonlítjuk a (c) pontban kapott értéket a monoklonális ellenanyagoknak egy egészséges egyéntől nyert minta T-sejtjeihez történő kötődésének mértékével, ahol a kötődés mértékének fenti értékei közötti lényeges különbségből arra következtetünk, hogy a vizsgált egyénnek nagy valószínűséggel rosszindulatú megbetegedése van.

16. A 15. igénypont szerinti vizsgálati eljárás, *azzal jellemezve, hogy* a (b) lépést megelőzően elkülönítjük a perifériás vérből származó mononuclearis sejteket (PMBC), majd az elkülönített PMBC-eket a (c) lépésben az 1-8. igénypontok szerinti monoklonális ellenanyagok közül legalább eggyel érintkeztetjük.

17. A 15. vagy 16. igénypontok szerinti vizsgálati eljárás, *azzal jellemezve, hogy* testfolyadékként vért vizsgálunk.

18. Vizsgálati eljárás egy vizsgált egyén egy meghatározott rosszindulatú megbetegedésének nagy valószínűséggel történő kimutatására, *azzal jellemezve, hogy*

(a) az egyéntől testfolyadék-mintát nyerünk;

(b) a mintát az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti monoklonális ellenanyagokkal érintkeztetjük;

(c) meghatározzuk a monoklonális ellenanyagok mintabeli T-sejtekhez történő kötődésének mértékét;

(d) a kötődés (c) pontban megállapított mértékének összehasonlítása a monoklonális ellenanyagok egészséges páciensből nyert T-sejtekhez történő kötődésének mértékével, ahol a két kötődés mértéke közötti lényeges mértékű különbségből arra következtetünk, hogy a vizsgált páciens nagy valószínűséggel rosszindulatú megbetegedésben szenved; valamint ha a páciensből nyert T-sejtekhez történt kötődés mértéke alacsonyabb vagy magasabb a monoklonális ellenanyagok egészséges páciens T-sejtjeihez történő kötődésének mértékénél, abból nagy valószínűséggel a vizsgált páciens meghatározott típusú rosszindulatú megbetegedésére következtetünk.

19. A 18. igénypont szerinti vizsgálati eljárás, azzal jellemezve, hogy a (b) lépést megelőzően a mintából PBMC-ket különítünk el, amelyeket a (c) lépésben a találmány szerinti monoklonális ellenanyagokkal érintkeztetünk.

20. A 18. vagy 19. igénypont szerinti vizsgálati eljárás, azzal jellemezve, hogy a monoklonális ellenanyagok vizsgált egyénből származó T-sejtekhez történő kötődésének mértéke magasabb annál, mint ami ugyanazon monoklonális ellenanyagok alkalmazásával egészséges egyének T-sejtjeivel kapcsolatban állapítható meg.

21. A 20. igénypont szerinti vizsgálati eljárás, azzal jellemezve, hogy meghatározott típusú rosszindulatú megbetegedésként prosztatatarákot állapítunk meg.

22. A 18. vagy 19. igénypont szerinti vizsgálati eljárás, azzal jellemezve, hogy a monoklonális ellenanyagok vizsgált egyénből származó T-sejtekhez történő kötődésének mértéke alacsonyabb annál, mint ami ugyanazon monoklonális ellenanyagok alkalmazásával egészséges egyének T-sejtjeivel kapcsolatban állapítható meg.

23. A 22. igénypont szerinti vizsgálati eljárás, azzal jellemezve, hogy meghatározott típusú rosszindulatú megbetegedésként emlőrákot állapítunk meg.

24. A 22. igénypont szerinti vizsgálati eljárás, azzal jellemezve, hogy meghatározott típusú rosszindulatú megbetegedésként vastagbélrákot állapítunk meg.

25. Gyógyászati készítmény, amely az 1-8. igénypontok szerinti monoklonális ellenanyagok közül egyet vagy többet, valamint gyógyászati szempontból elfogadható hordozóanyagot tartalmaz.

26. Diagnosztikai reagenskészlet, amely az 1-8. igénypontok szerinti monoklonális ellenanyagok közül egyet vagy többet, a monoklonális ellenanyagok egy specifikus kötőpartnerének konjugátumát, kimutatást lehetővé tevő jelet biztosító jelzőanyagot és használati utasítást tartalmaz.

27. Gyógyászati készítmény, amely aktív összetevőként az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti egy vagy több monoklonális ellenanyagot, valamint gyógyászati szempontból elfogadható hordozóanyagot tartalmaz.

28. A 27. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, rákos megbetegedés gyógykezelésében történő alkalmazásra.

29. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti monoklonális ellenanyagok alkalmazása egy egyén rosszindulatú megbetegedéseinek gyógykezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására.

30. Eljárás rosszindulatú megbetegedések gyógykezelésére, azzal jellemezve, hogy a rászoruló betegnek az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti monoklonális ellenanyagok közül egyet vagy többet gyógyászati szempontból hatékony dózisban beadunk.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

dr. Pethő Árpád

szabadalmi ügyvivő

58 oldal leírás

26 oldal rajz

84 oldal



D1

TACTAGTCGACATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCTGTATGGCAGCTGCCCAAAGTATCCAAGCACA
ATGATCAGCTGTACCGAACCCACACCTGGAACGATAAGGACTACCGTCGACGGGTTTCATAGGTTTCGTGT
M A W V W T L L F L M A A A Q S I Q A Q

GATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGTTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCT
CTAGGTCAACCCACGTAGACCTGGACTCAACTTCTTCGGACCTCTCTGTCAAGTCTTAGAGGACGTTCCGA
I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S C K A

TCTGGATATACTTTCACAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGTTTAAAGTGGA
AGACCTATATGAAGTGTGTGATACCTTACTTGACCCACTTCGTCCGAGGTCCTTCCCAAATTTCACCT
S G Y T F T N Y G M N W V K Q A P G K G L K W

TGGGCTGGATAAACACCCGACAGTGGAGAGTCAACATATGCTGAAGAGTTC AAGGGACGGTTTGCCCTTCTC
ACCCGACCTATTGTGGCTGTACCTCTCAGTTGTATACGACTTCTCAAGTTCCTCCGCAACGGAAGAG
M G W I N T D S G E S T Y A E E F K G R F A F S

TTTGGAACCTCTGCCAACACTGCCCTATTTCAGAGATCAACAACCTCAACAATGAGGACACGCCCTACATAT
AAACCTTTGGAGACGGTTGTGACGGGATAAACGTCTAGTTGTTGGAGTTGTTACTCCTGTGCGGATGTATA
L E T S A N T A Y L Q I N N L N N E D T A T Y

TTCTGTGTGAGAGTCGGCTACGATGCTTTGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAA
AAGACACACTCTCAGCCGATGCTACGAAACCTGATGACCCCAAGTTCCTTGGAGTCAGTGGCAGAGGAGTT
F C V R V G Y D A L D Y W G Q G T S V T V S S

CTACAACAACAGCCCCCATCTGTCTATCCCTTCCCGGTTCCA
GATGTTGTTGTCGGGTAGACAGATAGGGAAGGGCCCCAAGGT

1. ábra

ACTAGTCGACATGGATTACAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAAATGTCC
TGATCAGCTGTACCTAAATGTCCACGTCTAATAGTCGAAGGACGATTAGTCACGGAGTCAGTATTACAGG
M D L Q V Q I I S F L L I S A S V I M S

AGAGGACAAATTGTTCTCACCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGAGAAGGTCACCATAA
TCTCCTGTTTAAACAAGAGTGGTCCAGAGGTCGTTAGTACAGACGTAGAGGTCCTCCTCCAGTGGTATT
R G Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I

CCTGCAGTGCCAGGTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGCACTTCTCCCAAAC
GGACGTCACGGTCCAGTTCACATTCAATGTACGTGACCAAGTCGTCTTCGGTCCGTGAAGAGGGTTTGA
T C S A R S S V S Y M H W F Q Q K P G T S P K L

CTGGATTATAGGACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACC
GACCTAAATATCCTGTAGTTGGACCGAAGACCTCAGGGACGAGCGAAGTCACCGTCACCTAGACCCCTGG
W I Y R T S N L A S G V P A R F S G S G S G T

TCTTACTGTCTCAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAGGAGTA
AGAATGACAGAGTGTAGTCGGCTTACCTCCGACTTCTACGACGGTGAATAATGACGGTCGTTTCTCTCAT
S Y C L T I S R M E A E D A A T Y Y C Q Q R S

GTTTCCCACTCAGTTCGGCTCGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATC
CAAGGGTGAGTGCAAGCCGAGCCCTGTTCACACCTTTATTGCCCCGACTACGACGTGGTTGACATAG
S F P L T F G S G T K L E I K

CA'TCTTCCCACCATCCAAGATCT
GTAGAAGGGTGGTAGGTTCTAGA

2. ábra

BAT: QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMN-WVKQAPGKGLKWMG
 VMS2:

BAT: WINT-DSGESTYAEFEKGRFAFSLETSANTAYLQINNLLNNEDTATYFCVR
 VMS2A: NT..P.....S.....K.....A.

BAT: VGYDA-----LDYWGQGTSTVTVSS
 VMS2: R..YYGSR.....YGAM.....

H53-as aminosav (Kabat)

BAT: Asp (D) Csírvonal: Asn (N)

Egér V_HMisc.

Összes egér V_H

aminosav	Gyakoriság (%)
Ile	43,33
Pro	25,00
Thr	20,00
Leu	6,67
Ser	1,67
His	1,67
Val	1,67

aminosav	Gyakoriság (%)
Gly	27,60
Asn	25,98
Tyr	13,72
Ser	11,02
Ala	7,33
<u>Asp</u>	<u>4,93</u>
Trp	2,06
Arg	1,84
His	1,63
Glu	1,50
Thr	0,73
Phe	0,47
Lys	0,43
Val	0,26
Leu	0,17
Pro	0,13
Ile	0,09
Gin	0,09
Cys	0,04

3. ábra

H54-es aminosav (Kabat)

BAT: Ser(S) Csírvonal: Thr (T)

Egér V _H Misc. aminosav	Gyakoriság (%)	Összes egér V _H aminosav	Gyakoriság (%)
Tyr	30,51	Asn	28,79
Asn	25,42	<u>Ser</u>	26,18
Thr	23,73	Gly	22,72
His	5,08	Asp	13,70
<u>Ser</u>	5,08	Thr	3,94
Lys	3,39	Lys	1,63
Asp	3,39	Tyr	1,34
Leu	1,69	Ile	0,38
Ala	1,69	Arg	0,29
		Ala	0,25
		His	0,25
		Pro	0,17
		Phe	0,13
		Trp	0,08
		Cys	0,08
		Val	0,04
		Leu	0,04

Residue H 57 (Kabat)

BAT: Ser(S) Csírvonal: Pro (P)

Egér V _H Misc. aminosav	Gyakoriság (%)	Összes egér V _H aminosav	Gyakoriság (%)
Pro	100,00	Thr	77,80
		Ile	11,89
		Pro	2,49
		<u>Ser</u>	2,11
		Lys	1,91
		Asn	1,62
		Ala	0,87
		Leu	0,41
		Val	0,17
		His	0,17
		Arg	0,12
		Gln	0,08
		Met	0,08
		Phe	0,08
		Gly	0,08
		Tyr	0,04
		Cys	0,04
		Asp	0,04

3. ábra folytatása

PCT/IL99/00518

H76-os aminosav (Kabat)

BAT: Asn (N) Csírvonal: Ser (S)

Egér V_HMisc.

aminosav	Gyakoriság (%)
Ser	58,33
Asn	38,33
Ile	1,67
Tyr	1,67

Összes egér V_H

aminosav	Gyakoriság (%)
Ser	66,26
Asn	29,73
Thr	1,42
Arg	0,90
Lys	0,34
Asp	0,34
Gly	0,26
Ile	0,22
Tyr	0,17
Ala	0,13
Gln	0,09
His	0,09
Glu	0,04

H83-aminosav (Kabat)

BAT: Asn (N) Csírvonal: Lys (K)

Egér V_HMisc.

aminosav	Gyakoriság (%)
Arg	51,67
Lys	35,00
Thr	8,33
Gln	1,67
Ser	1,67
Asn	1,67

Összes egér V_H
aminosav

aminosav	Gyakoriság (%)
Thr	60,98
Arg	18,32
Lys	8,69
Gln	8,69
Asp	1,77
Ala	0,91
Ser	0,35
Asn	0,13
Ile	0,09
His	0,04
Glu	0,04

3. ábra folytatása

H93-as aminosav (Kabat), Vernier aminosav

BAT: Val (V) Csírvonal: Ala (A)

Egér V_HMisc.

aminosav	Gyakoriság (%)
Ala	62,71
Met	25,42
Thr	3,39
Val	3,39
Lys	1,69
Leu	1,69
Asn	1,69

Összes egér V_H

aminosav	Gyakoriság (%)
Ala	83,26
Thr	8,03
Val	3,74
Ser	1,36
Gly	1,27
Met	0,89
Asn	0,34
Pro	0,26
Lys	0,21
Trp	0,17
Asp	0,13
Ile	0,13
Leu	0,08
Tyr	0,04
Phe	0,04
His	0,04

H95-ös aminosav (Kabat)

BAT: Val (V) Csírvonal: Arg (R)

Egér V _H Misc. aminosav	Gyakoriság (%)
Tyr	25,42
Asp	13,56
Trp	11,86
Ser	10,17
Arg	10,17
Gly	6,78
Pro	5,08
Gln	5,08
His	5,08
Lys	3,39
Cys	1,69
Phe	1,69

Összes egér V _H aminosav	Gyakoriság (%)
Ser	16,24
Tyr	15,18
Gly	13,81
Asp	13,28
Arg	9,00
Glu	4,41
Asn	4,37
Leu	3,53
Pro	2,96
His	2,47
Ala	2,43
Trp	2,38
Thr	1,94
Lys	1,68
Gln	1,50
Val	1,15
Ile	1,15
Phe	1,10
Cys	1,06
Met	0,35

3. ábra folytatása

H98-as aminosav (Kabat)

BAT: Asp (D) Csírvonal: Tyr (Y)Egér V_HMisc.

aminosav	Gyakoriság (%)
<i>Tyr</i>	56,00
Gly	10,00
Thr	6,00
Ala	6,00
Asn	4,00
Ser	4,00
<u>Asp</u>	<u>4,00</u>
Leu	2,00
Arg	2,00
Pro	2,00
Ile	2,00
Lys	2,00

Összes egér V_H

aminosav	Gyakoriság (%)
<i>Tyr</i>	32,11
Gly	24,52
<u>Asp</u>	<u>6,79</u>
Ser	6,16
Arg	4,51
Asn	4,41
Thr	3,61
Leu	3,61
Ala	2,18
Phe	2,07
Val	1,70
Trp	1,65
Pro	1,59
Ile	1,22
Lys	1,06
His	1,01
Glu	0,80
Gln	0,69
Met	0,21

3. ábra folytatása

H99-es aminosav (Kabat)

BAT: Ala (A) Csírvonal: Tyr (Y)

Egér V _H Misc. aminosav	Gyakoriság (%)	Összes egér V _H aminosav	Gyakoriság (%)
Trp	28,26	Gly	27,95
Gly	15,22	Tyr	16,87
Ser	15,22	Ser	16,76
Tyr	13,04	Arg	6,63
Pro	6,52	Asp	4,20
Met	4,35	Asn	4,03
Arg	4,35	Thr	3,73
Asn	4,35	<u>Ala</u>	<u>3,20</u>
Asp	2,17	Leu	3,02
Phe	2,17	Pro	2,78
His	2,17	Phe	2,61
<u>Ala</u>	<u>2,17</u>	Val	2,25
		Glu	1,24
		His	0,89
		Lys	0,89
		Gln	0,83
		Ile	0,83
		Met	0,53
		Trp	0,53
		Cys	0,18
		Other	0,06

H100K-s aminosav (Kabat)

BAT: Leu (L) Csírvonal: Met (M)

Egér V _H Misc. aminosav	Gyakoriság (%)	Összes egér V _H aminosav	Gyakoriság (%)
Gln	61,54	Phe	70,91
Thr	25,00	Met	24,40
Ala	13,46	<u>Leu</u>	<u>2,46</u>
		Ile	0,59
		Val	0,53
		Ser	0,41
		Tyr	0,35
		Thr	0,18
		Ala	0,06
		His	0,06
		Gly	0,06

3. ábra folytatása

BAT: QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSARS-----SVSYMHWFQQKPGTSPKLWIY
H4: S...S.....Y.Y.....S...P...

BAT: RTSNLASGVPARFSGSGSGTSYCLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFP-----PLT
H4: S...S.....YH.Y.....-F.

BAT: FGSGTKLEI-K
H4:

Aminosav L 22 (Kabat)

BAT: Thr (T) Csírvonal: Ser (S)

Egér V_xMisc.

Összes egér V_x

aminosav	Gyakoriság (%)
<u>Thr</u>	<u>98,09</u>
Ser	1,27
Ile	0,64

aminosav	Gyakoriság (%)
Ser	50,26
<u>Thr</u>	<u>46,44</u>
Asn	1,16
Arg	0,71
Phe	0,32
Pro	0,26
Ala	0,26
Tyr	0,19
Ile	0,19
Cys	0,13
Other	0,06

4. ábra

L26-os aminosav (Kabat)

BAT: Arg (R) Csírvonal: Ser (S)Egér V_xVI

aminosav	Gyakoriság (%)
Ser	96,79
<u>Arg</u>	<u>1,92</u>
Ile	0,64
Thr	0,64

Összes egér V_x

aminosav	Gyakoriság (%)
Ser	96,09
Asn	1,41
<u>Thr</u>	<u>1,28</u>
<u>Arg</u>	<u>0,64</u>
Ile	0,32
Cys	0,06
Met	0,06
Leu	0,06
Gly	0,06

L26-os aminosav (Kabat)

BAT: His (H) Csírvonal: Tyr (Y)Egér V_xVI

aminosav	Gyakoriság (%)
Tyr	85,62
Phe	13,73
<u>His</u>	<u>0,65</u>

Összes egér V_x

aminosav	Gyakoriság (%)
<u>His</u>	<u>35,78</u>
Asn	20,49
Ala	18,73
Tyr	7,89
Glu	6,14
Ser	5,20
Gln	2,00
Thr	1,57
Val	0,38
Phe	0,38
Asp	0,38
Gly	0,38
Ile	0,25
Cys	0,13
Arg	0,13
Trp	0,06
Leu	0,06
Lys	0,06

4. ábra folytatása

L36-os aminosav (Kabat), Vernier aminosav

BAT: Phe (F) Csírvonal: Tyr (Y)

Egér V_xVI

aminosav	Gyakoriság (%)
Gln	98,76
His	1,24

Összes egér V_x

aminosav	Gyakoriság (%)
Tyr	82,43
<u>Phe</u>	<u>11,13</u>
Leu	4,44
His	0,88
Asn	0,38
Ser	0,19
Cys	0,13
Val	0,13
Asp	0,06
Ala	0,06
Trp	0,06
Ile	0,06
Other	0,06

L42-es aminosav (Kabat)

BAT: Thr (T) Csírvonal: Ser (S)

Egér V_xVI

aminosav	Gyakoriság (%)
Pro	100,00

Összes egér V_x

aminosav	Gyakoriság (%)
Gln	44,92
<u>Thr</u>	<u>18,73</u>
Lys	10,28
Gly	9,90
Ser	7,83
Glu	2,44
Ala	1,88
Phe	1,75
Asn	1,13
Arg	0,63
His	0,19
Trp	0,06
Val	0,06
Pro	0,06
Ile	0,06
Other	0,06

4. ábra folytatása

Val 1,27

Arg	19,36
Pro	4,53
Thr	2,94
Ala	1,23
Val	0,92
Ile	0,55
Phe	0,43
Gly	0,37
Ser	0,25
His	0,12
Gln	0,06
Asp	0,06
Met	0,06
Lys	0,06

L72-es aminosav L 72 (Kabat)

BAT: Cys (C) Csírvonal: Ser (S)Egér V_xVI

aminosav	Gyakoriság (%)
Ser	96,89
Thr	3,11

Összes egér V_x

aminosav	Gyakoriság (%)
Ser	50,52
Thr	47,44
Val	0,56
Ala	0,37
Pro	0,31
Ile	0,31
Phe	0,19
Arg	0,12
Tyr	0,12
Lys	0,06

4. ábra folytatása

L77-es aminosav (Kabat)

BAT: Arg (R) Csírvonal: Ser (S)Egér V_xVI

aminosav	Gyakoriság (%)
Ser	83,33
<u>Arg</u>	10,36
Thr	3,85
Pro	1,28
Ile	1,28

Összes egér V_x

aminosav	Gyakoriság (%)
Ser	48,12
<u>Arg</u>	23,28
Asn	13,14
Pro	10,51
Thr	3,69
Gly	0,50
Cys	0,19
Ala	0,13
Asp	0,13
Ile	0,13
Val	0,06
Tyr	0,06
Glu	0,06

L91-es aminosav L 91 (Kabat)

BAT: Arg (R) Csírvonal: Tyr (Y)Egér V_xVI

aminosav	Gyakoriság (%)
Trp	80,63
<u>Arg</u>	8,75
Gly	6,25
Phe	1,88
Tyr	1,25
Asp	0,62
Ser	0,62

Összes egér V_x

aminosav	Gyakoriság (%)
Trp	20,41
Gly	19,33
Ser	18,76
<u>Tyr</u>	15,40
His	8,49
Asp	4,37
Phe	3,36
<u>Arg</u>	2,47
Asn	1,90
Leu	1,52
Thr	0,82
Val	0,76
Cys	0,76
Ala	0,63
Ile	0,44
Gln	0,25
Met	0,19
Other	0,13

4. ábra folytatása

L92-es aminosav (Kabat)

BAT: Ser (S) Csírvonal: His (H)

Egér V _x VI aminosav	Gyakoriság (%)
<u>Ser</u>	<u>74,52</u>
Asn	12,10
Thr	8,92
Arg	1,27
Tyr	1,27
Gly	0,64
His	0,64
Asp	0,64

Összes egér V _x aminosav	Gyakoriság (%)
<u>Ser</u>	<u>33,10</u>
Asn	14,19
Thr	12,72
Tyr	12,46
His	5,24
Asp	4,28
Leu	4,22
Arg	3,26
Trp	2,81
Lys	1,79
Ala	1,66
Gly	1,28
Val	1,09
Gln	0,83
Ile	0,58
Cys	0,26
Phe	0,19
Met	0,06

L94-es aminosav (Kabat)

BAT: Phe (F) Csírvonal: Tyr (Y)

Egér V _x VI aminosav	Gyakoriság (%)
Asn	66,67
Tyr	15,72
Pro	11,32
Ser	3,77
Ile	0,63
Leu	0,63
Lys	0,63
His	0,63

Összes egér V _x aminosav	Gyakoriság %
Tyr	19,54
Asn	16,83
Val	14,89
Leu	13,35
Ser	6,90
<u>Phe</u>	<u>6,45</u>
Thr	6,25
Asp	4,96
Ile	4,00
Trp	2,39
Ala	0,97
Pro	0,84
His	0,58
Gln	0,52
Met	0,45
Lys	0,39
Gly	0,19
Cys	0,19
Arg	0,19
Glu	0,13

4. ábra folytatása

PCT/IL99/00518

L95-ös aminosav (Kabat)

BAT: Pro (P) Csírvonal: Gap (-)

Egér V_xVI

aminosav	Gyakoriság (%)
Arg	100,00

Összes egér V_x

aminosav	Gyakoriság (%)
Thr	98,30
<u>Pro</u>	<u>0,35</u>
Ser	0,28
Met	0,21
Val	0,21
Phe	0,21
Leu	0,14
Ala	0,07
Arg	0,07
Lys	0,07
Other	0,07

L96-os aminosav (Kabat)

BAT: Leu (L) Csírvonal: Phe (F)

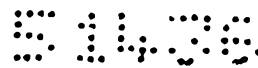
Egér v_xVI

aminosav	Gyakoriság (%)
<u>Leu</u>	<u>57,14</u>
Ile	17,01
Tyr	7,48
Trp	6,80
Phe	5,44
Pro	2,72
Arg	2,04
His	0,68
Val	0,68

Összes egér V_x

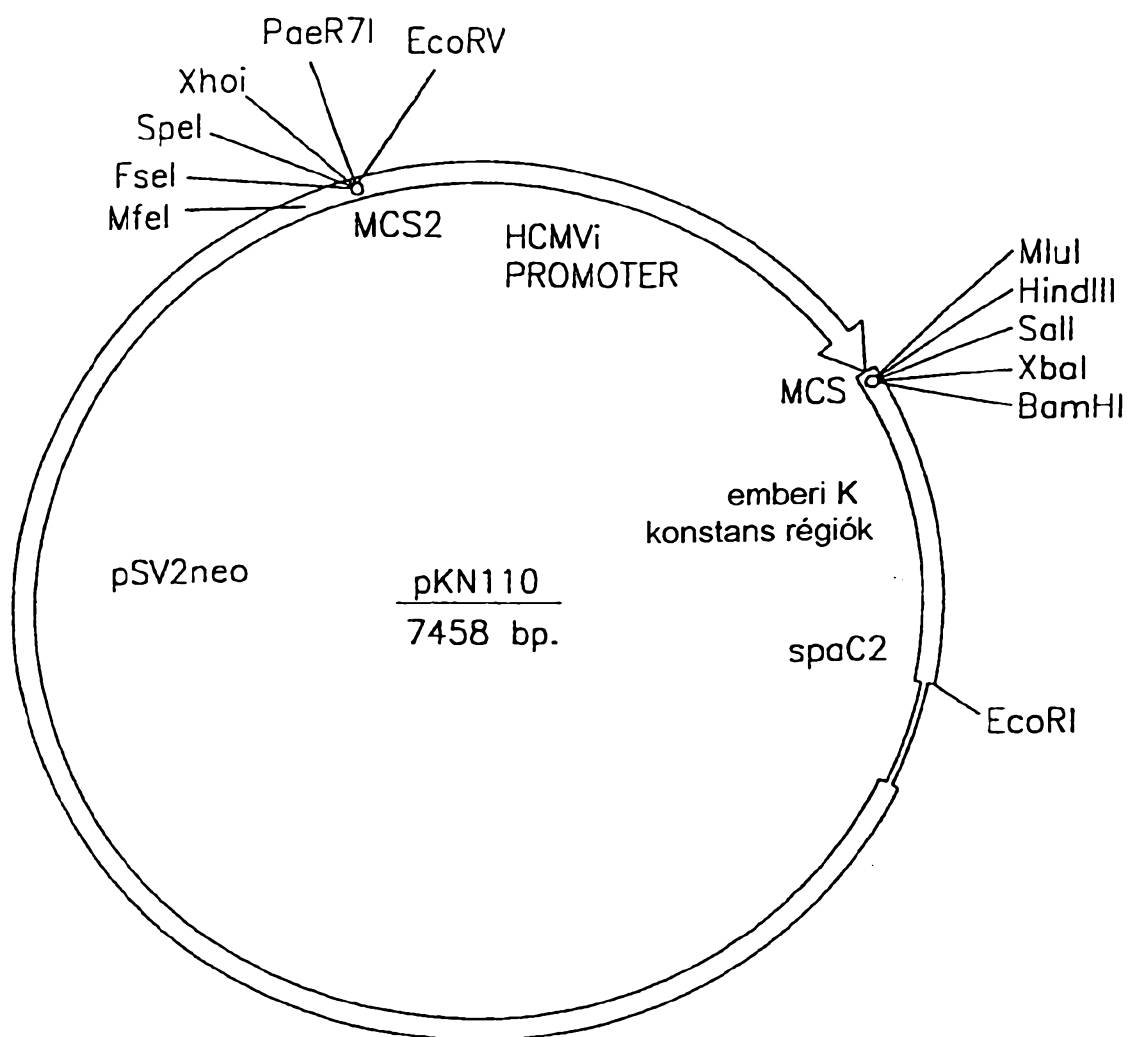
aminosav	Gyakoriság (%)
<u>Phe</u>	<u>99,37</u>
<u>Leu</u>	<u>0,28</u>
Gly	0,21
Arg	0,07
Val	0,07

4. ábra folytatása

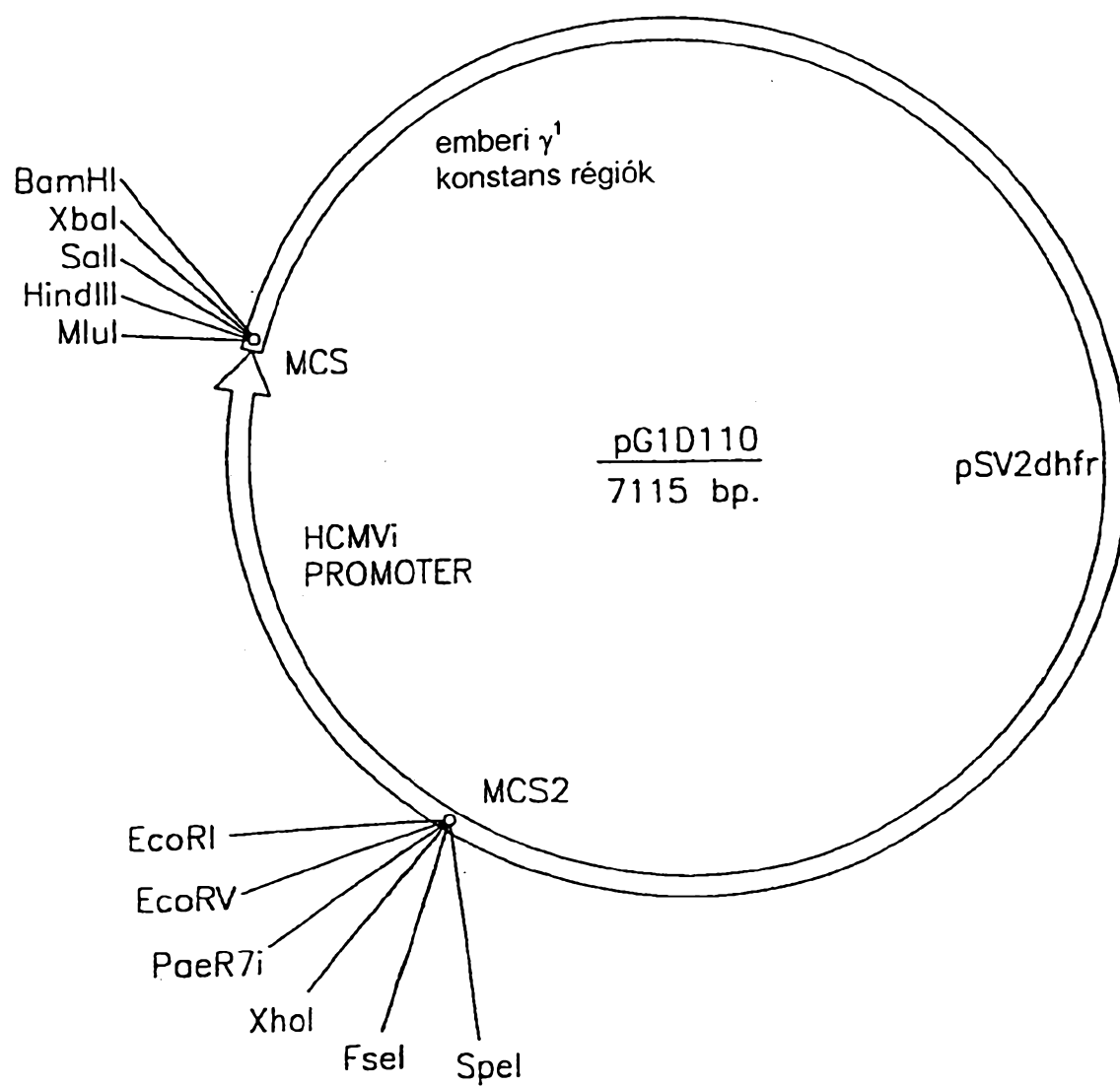


AAGCTTGCCGCCACCATGGATTACAGGTGCAGATTATCAGCTTCTGCTAATCAGTGCC
TTCGAACGGCGGTGGTACCTAAATGTCCACGTCTAATAGTCGAAGGACGATTAGTCACGG
M D L Q V Q I I S F L L I S A
TCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCA
AGTCAGTATTACAGGTCTCCTGTTTAAACAAGAGTGGTCAGAGGTCGTTAGTACAGACGT
S V I M S R G Q I V L T Q S P A I M S A
TCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATAACTGCAGTGCCAGGTCAGTGAAGTTACATGCAC
AGAGGTCCCCCTCTTCCAGTGGTATTGGACGTCACGGTCCAGTTCACATTCAATGTACGTG
S P G E K V T I T C S A R S S V S Y M H
TGGTTCCAGCAGAAGCCAGGCACCTTCTCCAAACTCTGGATTATAGGACATCCAACCTG
ACCAAGGTCGTCTTCCGGTCCGTGAAGAGGGTTTGAGACCTAAATATCCTGTAGTTGGAC
W F Q Q K P G T S P K L W I Y R T S N L
GCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGACCTTACTGTCTCACA
CGAAGACCTCAGGGACGAGCGAAGTCACCGTCACCTAGACCCCTGGAGAATGACAGAGTGT
A S G V P A R F S G S G S G T S Y C L T
ATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGTAGTTTC
TAGTCGGCTTACCTCCGACTTCTACGACGGTGAATAATGACGGTCGTTTCCTCATCAAAG
I S R M E A E D A A T Y Y C Q Q R S S F
CCACTCACGTTCCGGCTCGGGACAAAGTTGGAATAAAACGTGAGTGGATCC
GGTGAGTGCAAGCCGAGCCCCCTGTTTCAACCTTATTTGCACTCACCTAGG
P L T F G S G T K L E I K

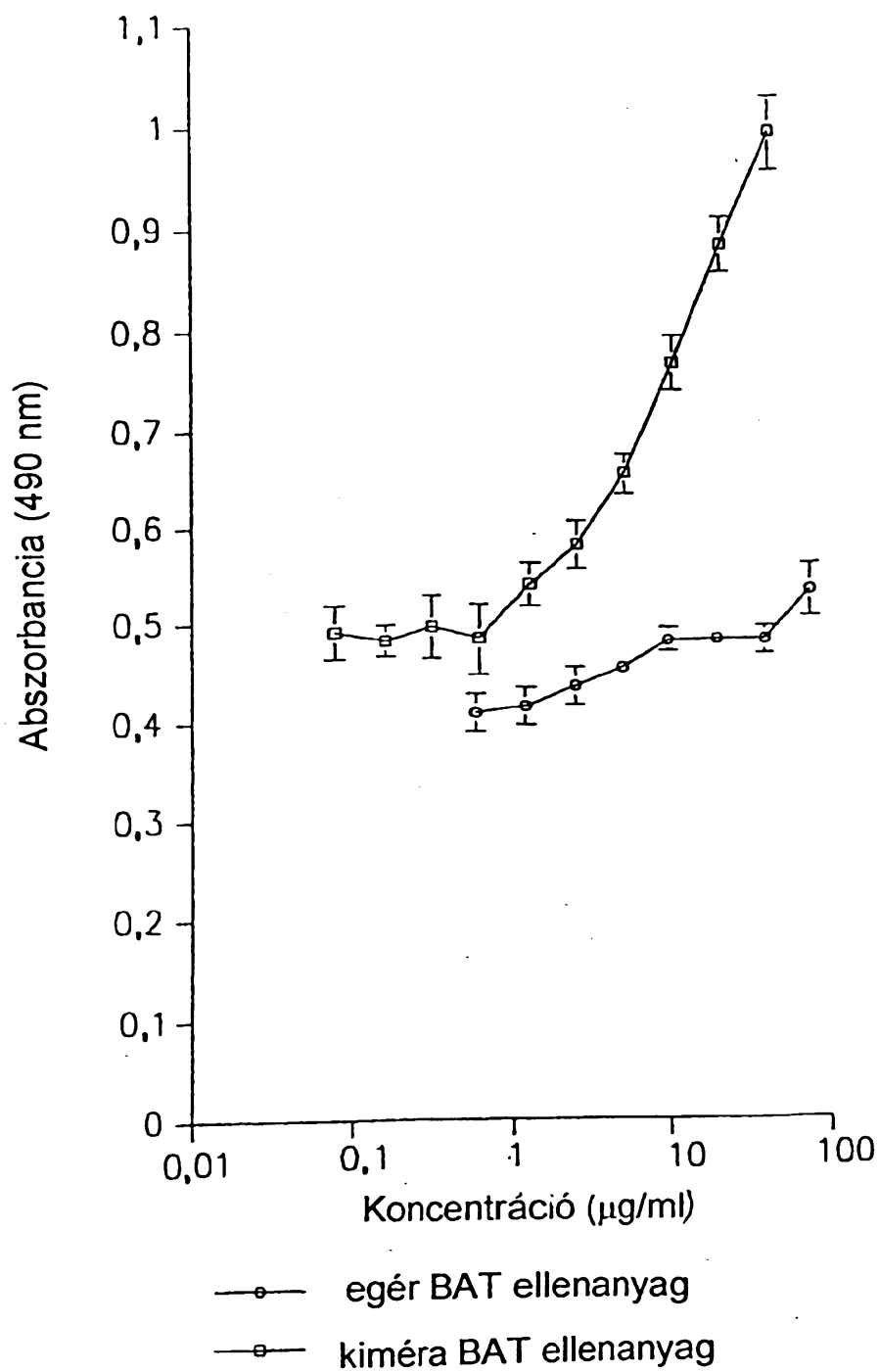
AAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGGGTGGACCTTGCTATTCTGATGGCAGCTGCCCAA
TTCGAACGGCGGTGCTACCGAACCCACACCTGGAACGATAAGGACTACCGTCGACGGTT
M A W V W T L L F L M A A A Q
AGTATCCAAGCACAGATCCAGTTGGTGCGAGTCTGGACCTGAGTTGAAGAAGCCTGGAGAG
TCATAGGTTTCGTGCTAGGTC AACCACCGTCAGACCTGGACTCAACTTCTTCGGACCTCTC
S I Q A Q I Q L V Q S G P E L K K P G E
ACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACTTTCACAAACTATGGAATGAACTGG
TGTCAGTTCTAGAGGACGTTCCGAAGACCTATATGAAAGTGTGTTGATACCTTACTTGACC
T V E I S C K A S G Y T F T N Y G M N W
GTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACAACCCGACAGTGGA
CACTTCGTCGAGGTCCTTCCCAAATTTCACCTACCCGACCTATTGTGGCTGTCACTT
V K Q A P G K G L K W M G W I N T D S G
GAGTCAACATATGCTGAAGAGTTCAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAACCTCTGCC
CTCAGTTGTATACGACTTCTCAAGTTCCTCCCAACGGAAGAGAAACCTTTGGAGACGG
E S T Y A E E F K G R F A F S L E T S A
AACACTGCCCTATTGTCAGATCAACAACCTCAACAATGAGGACACGGCTACATATTCTGT
TTGTGACGGATAAACGTC TAGTTGTTGGAGTTGTTACTCCTGTGCCGATGTATAAAGACA
N T A Y L Q I N N L N N E D T A T Y F C
GTGAGAGTCGGCTACGATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCC
CACTCTCAGCCGATGCTACGAACCTGATGACCCCAAGTTCCTTGGAGTCAGTGGCAGAGG
V R V G Y D A L D Y W G Q G T S V T V S
TCAGGTGAGTGGATCC
AGTCCACTCACCTAGG



7. ábra



8. ábra



9. ábra

Peptid 1: TINEEEKC:

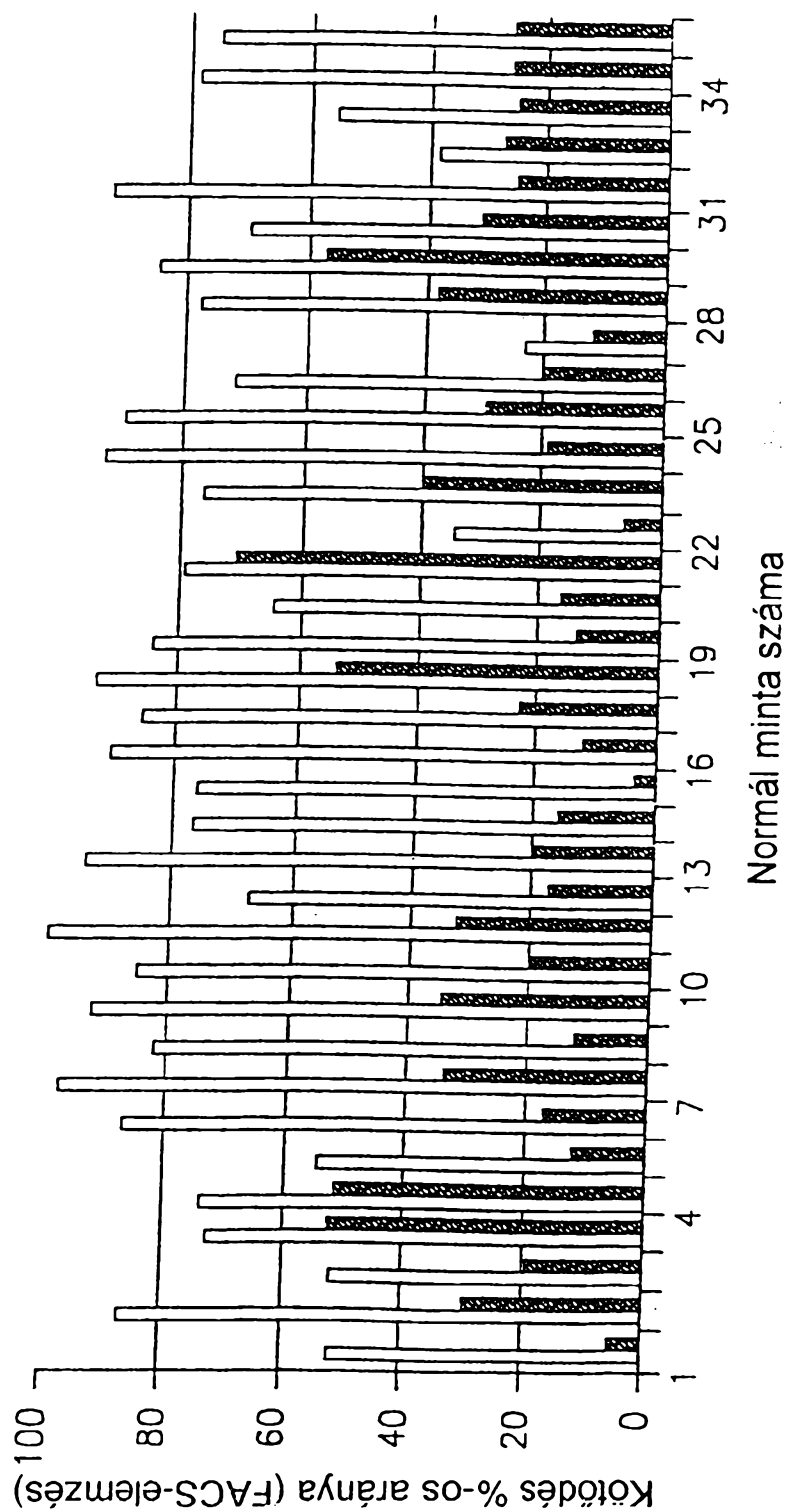
10. ábra

Peptid 1: NSGPSMRKKNVSIG

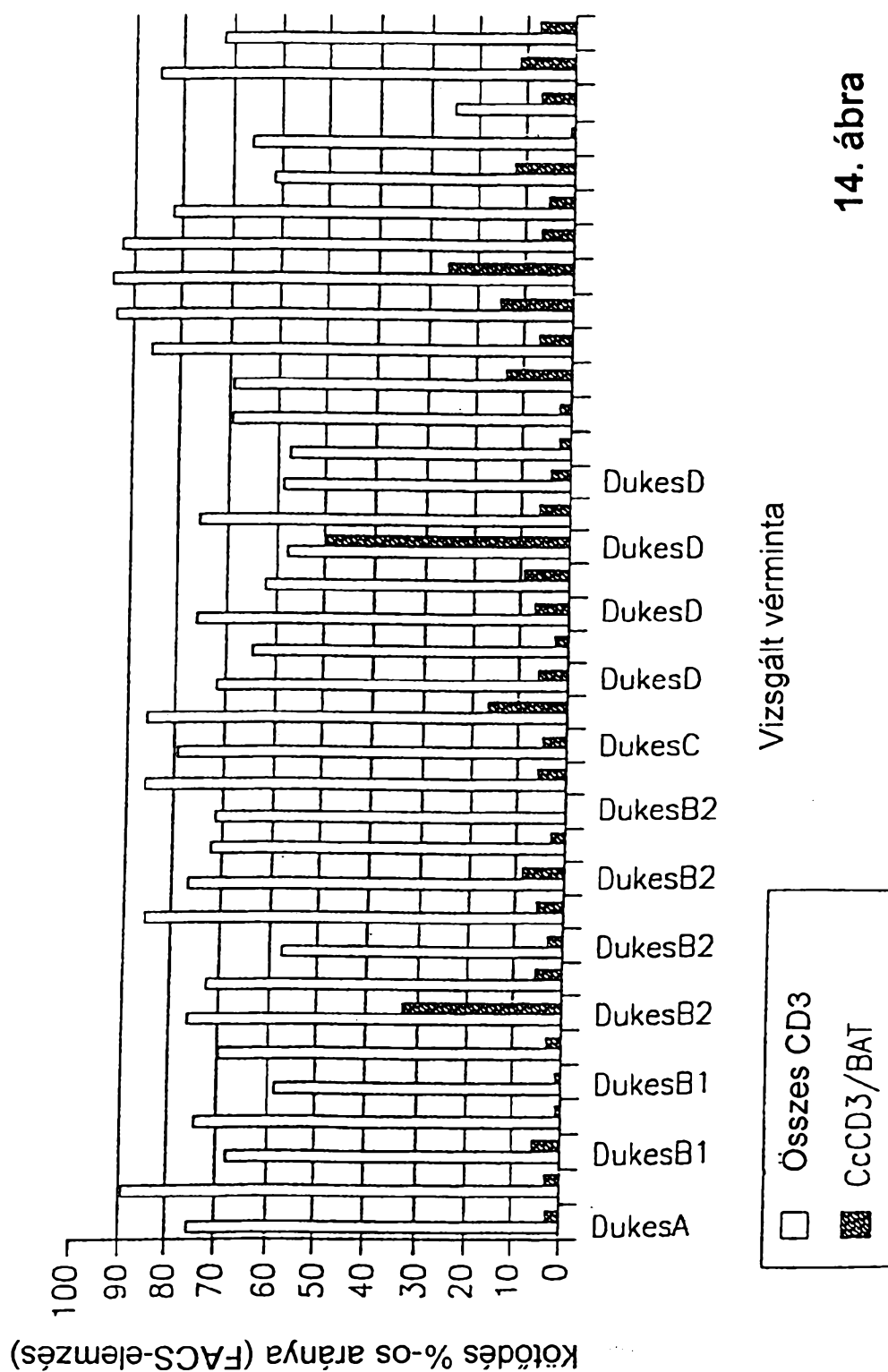
11. ábra

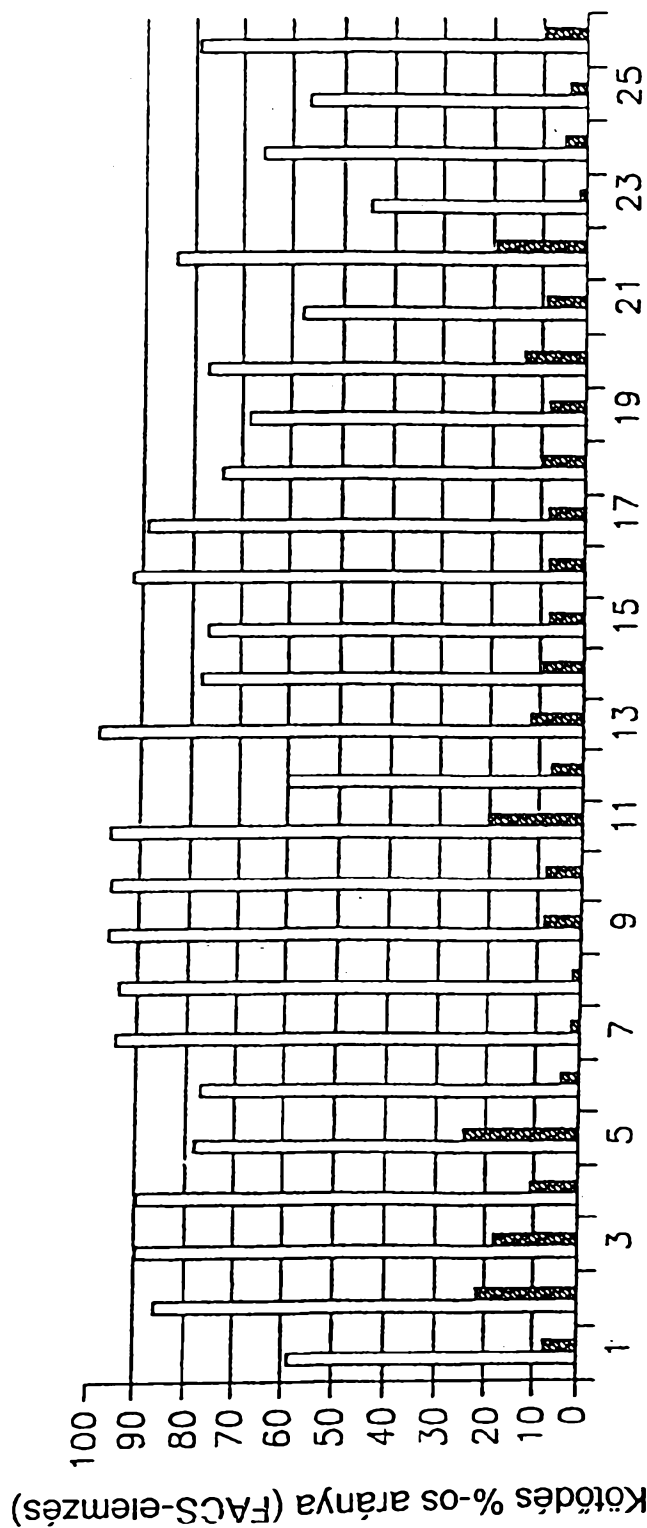
Peptid 1: IPDHQ

12. ábra



13. ábra

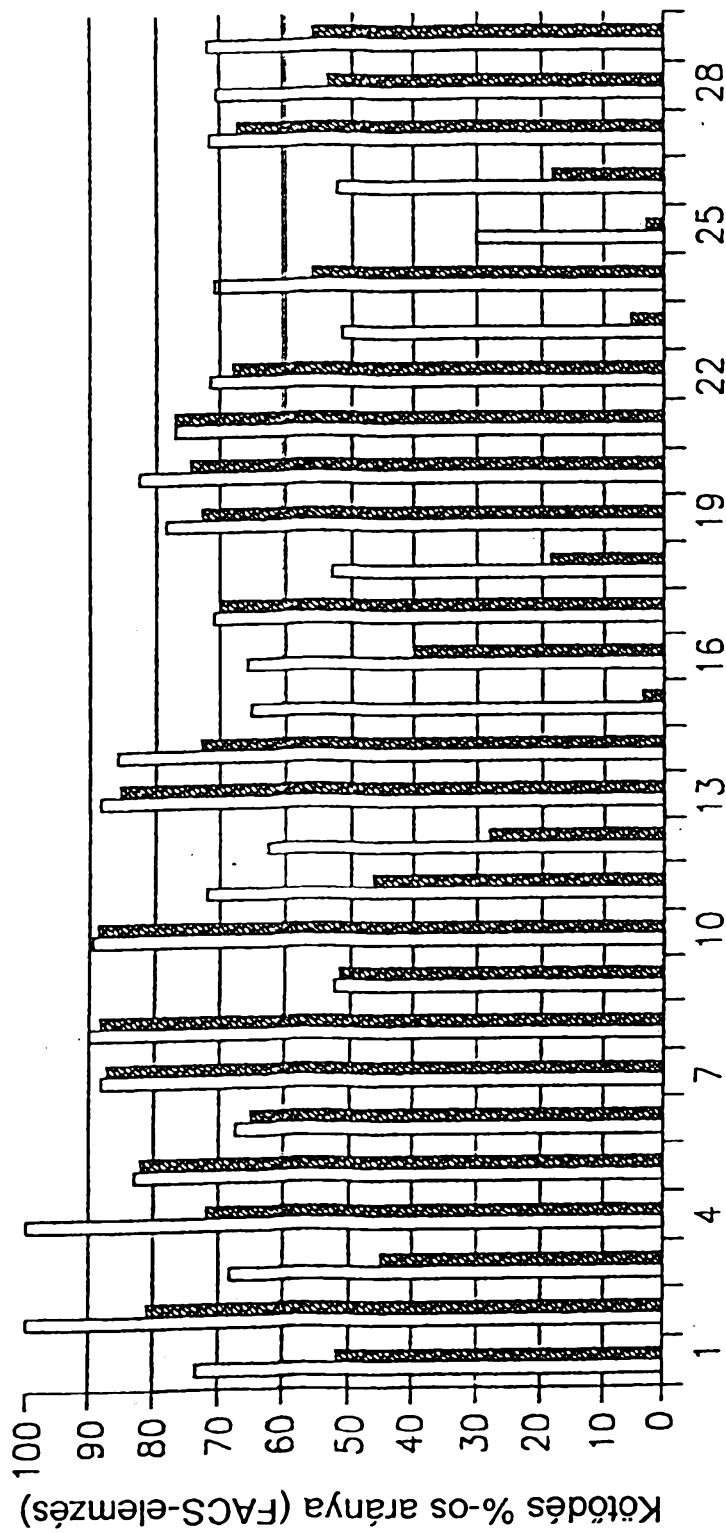




Vizsgált vérminta száma

□ Összes CD3
▨ emlőrák CD3/BAT

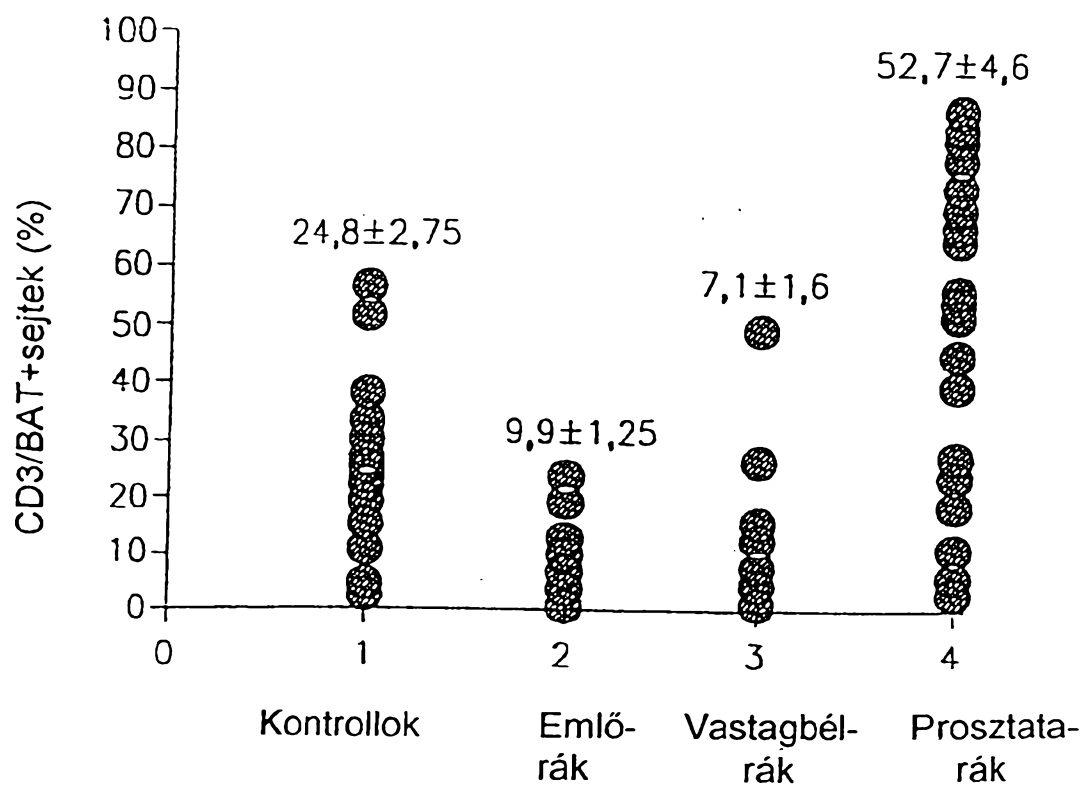
15. ábra



Vizsgált vérminta száma

Összes CD3
BAT/CD3

16. ábra



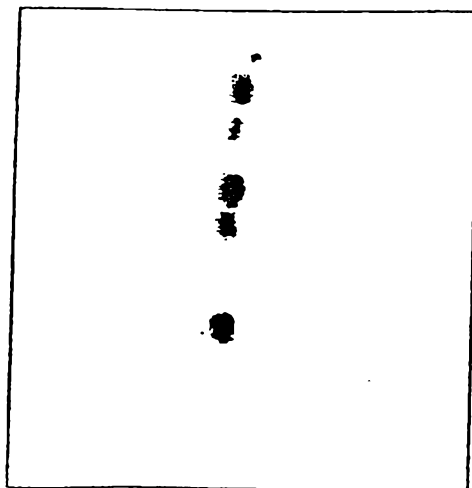
17. ábra

Prosztatara-k Ca
fül-, orr-, torok rák

prosztatara-k Ca

emlőrák

Daudi-sejt-
rétegek



18. ábra