

843/93

KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY

69790

165/1058

TNF-MUTEINEK

F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, Bazel, Svájc

A bejelentés napja: 1993. 03. 24.

Elsőbbsége: 1992. 04. 02. /92810249.0/

Európa

K I V O N A T

A találmány a humán p55-tumor nekrozis faktor receptor-hoz szelektív kötődési affinitást mutató humán tumor nekrozis muteinekre vonatkozik, amelyeket az jellemes, hogy a humán tumor nekrozis faktor aminosav szekvenciája legalább olyan változást tartalmaz, hogy a 86-helyzetben szarin maradék helyett treonin van jelen. A találmány továbbá valamely fenti muteint kódoló DNS szekvenciákra, ilyen DNS szekvenciát tartalmazó vektorokra, egy ilyen vektorral transzformált gazdas sejtekre, a fent meghatározott muteineknek a fenti gazdas sejtek által történő termelésére, a fenti muteineket tartalmazó gyógyászati készítményekre és a muteineknek betegségek kezelésére történő felhasználására vonatkozik.

*Handwritten signature:*  
F. Hoffmann-L. Roche AG  
Bazel, Switzerland

843/93

# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

165/1058

Képviselő: Dr.TÓTH-URBÁN László ügyvéd, Budapest  
Társképviselő: Dr.JALSOVSZKY Györgyné ügyvéd, Budapest

"A"

NSZQ<sub>6</sub>

165/1058

## TNF-MUTEINEK

F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, Bazel, Svájc

Feltalálók:

LESSLAUER Werner

Riehen, Svájc

LÖTSCHER Hansruedi

Möhlin, Svájc

STÜBER Dietrich

Grenzach-Wyhlen, Németország

A bejelentés napja: 1993. 03. 24.

Elsőbbsége: 1992. 04. 02. /92810249.0/

Európa

Az elsősorban stimulált makrofágok által termelt tumor nekrosis faktor, közelebbről a tumor nekrosis faktor-alfa /TNF- $\alpha$ / nevű citokin nem csupán különböző tumorsejtek ellen fejt ki jelentős citotoxicitást [Carswell és tsai: Proc. Nat. Acad. Sci., USA 72, 3666-3670 /1975/], hanem közvetítőként a gyulladásos folyamatokban és az immunválaszban is fontos szerepet játszik [lásd Beutler és Cerami áttekintése: "Tumor Necrosis Factor": Structure, Mechanism of Action, Role in Disease and Therapy, Karger, Basel

/1990/]. A humán tumor nekrozis faktor-alfa /hTNF- $\alpha$ / primer szerkezetét egy E. coli-ban klónozott és kifejezett cDNS nukleotid szekvenciájából következtették le [Pennica és tsai: Nature 312, 724-729 /1984/; Marmenout és tsai: Europ. J. Biochem. 152, 515-522 /1985/; Wand és tsai: Science 228, 149-154 /1985/; Shirai és tsai: Nature 313, 803-8606 /1985/]. A hTNF- $\alpha$  és a humán limfotoxin aminosav-szekvenciája között nagyfokú /30 %/ homológiát találtak; utóbbi anyag a gyakran tumor nekrozis faktor-betának /hTNF- $\beta$ / nevezett, főként limfociták által termelt citokin [Gray és tsai: Nature 312, 721-724 /1984/; Fiers és tsai: Cold Spring Harbour Symp. 51, 587-595 /1986/].

A módosított aminosav-szekvenciákat tartalmazó hTNF- $\alpha$ -t - u.n. TNF- $\alpha$ -muteinek - az irodalomban leírták [Yamagishi és tsai: Protein Engineering 3, 713-719 /1990/ vagy Fiers: "Tumor Necrosis Factors: Structure, Function and Mechanism of Action", Aggarwal és Vilcek /kiadók/, Marcel Dekker, Inc., New York nyomdában, vagy Fiers és tsai: Bonavista és Granger, 77-81. o. /s.a./]. Ezenkívül a TNF- $\alpha$ -muteinek számos szabadalmi bejelentés tárgyát képezik [pl. WO 86/02381, WO 86/04606, WO 88/06625 sz. nemzetközi szabadalmi bejelentések; 155 549, 158 286, 168 214, 251 037 és 340 333 sz. európai közrebocsájtott európai szabadalmi bejelentések; és 3 843 534 sz. német közrebocsájtási irat].

Az irodalomban a limfotoxin muteinjeit is leírták /pl. 250 000, 314 094 és 336 383 sz. közrebocsájtott európai szabadalmi bejelentések/.

A TNF biológiai hatásait specifikus receptorok közvetítik, éspedig a nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gél elektroforézis /SDS-PAGE/ szerint 55 kD látszólagos molekulatömegű receptor

/p55-TNF-R/ és az SDS-PAGE szerint 75 kD látszólagos molekula-tömegű receptor /p75-TNF-R/. A TNF-receptor mindkét formáját klónozták, és pedíg a p55-TNF-R receptort Loetscher és tsai [Cell. 61, 351-359 /1990/] és a p75-TNF-R receptort pl. Dembic és tsai [Cytokine 2, 53-58 /1990/]; mindkét receptor klónozását, továbbá pl. a 90116707.2 sz. európai szabadalmi bejelentésben ismertették/. Az utóbbi időben azt találták, hogy mindkét receptor nem csupán a TNF- $\alpha$ -t, hanem nagy affinitással a TNF- $\beta$ -t is megköti [Schönfeld és tsai: J. Biol. Chem. 266, 3863-3869 /1991/].

Az irodalomból jólismert, hogy a TNF- $\alpha$  biológiai aktivitásai alapján különböző rendellenességek kezelésére alkalmazható. Így pl. a TNF- $\alpha$  önmagában vagy interferonnal kombinálva hatékony tumorellenes szer lehet [Brouckaert és tsai: Int. J. Cancer 38, 763-769 /1986/]. E vegyület szélesebbkörű gyógyászati alkalmazását azonban szisztémás toxicitása gátolja [Taguchi T. és Sohmura Y: Biotherapy 3, 177-186 /1991/].

Azt találtuk, hogy egéren a humán TNF- $\alpha$  /hTNF- $\alpha$ /, amely csak a kisebb egér és patkány TNF receptorhoz /egér és patkány p55-TNF-R/ kötődik sokkal kevésbé toxikus, mint a mindkét egér TNF receptorhoz /p55-TNF-R és p75-TNF-R/ kötődő egér és patkány TNF- $\alpha$  /mTNF- $\alpha$ /. Így pl. C57Bl6 egéren a mTNF- $\alpha$  és hTNF- $\alpha$  LD<sub>50</sub> értéke 10  $\mu$ g/egér illetve 500  $\mu$ g/egér /lásd Brouckaert és tsai: Agents and Actions 26, 196-198 /1989/; Everaerdt B. és tsai: Biochem. Biophys. Res. Comm. 163, 378-385 /1989/; Lewis M. és tsai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2830 /1991/]. Ezért úgy tűnik, hogy a p75-TNF-R a szisztémás toxicitásban jelentős szerepet tölt be.

A hTNF- $\alpha$  és mTNF- $\alpha$  csaknem azonos mértékben kötődik a humán p55-TNF-R és humán p75-TNF-R receptorhoz. Azonban azok a hTNF- $\alpha$  mutánsok, amelyek a hp55-TNF-R által közvetített biológiai aktivitást megtartják, a hp75-TNF-R receptoron mutatott aktivitást azonban csaknem teljes egészében elvesztették, az egér- és patkányrendszerben a hTNF- $\alpha$  funkcionális ekvivalensei és primátusokban várhatóan kisebb szisztémás toxicitást mutatnak.

A humán p75-tumor nekrosis faktor receptorhoz /hp75-TNF-R/ és a humán p55-tumor nekrosis faktor receptorhoz /hp55-TNF-R/ szignifikáns mértékben eltérő kötődési affinitást mutató humán nekrosis faktor muteineket a 486 908 sz. közrebocsájtott európai szabadalmi bejelentésben irtak le.

Azt találtuk, hogy olyan hTNF muteinek vagy gyógyászati-lag alkalmas sóik, amelyek a humán tumor nekrosis faktor aminosav-szekvenciája legalább 86-helyzetében változást tartalmaznak /a szerin maradék helyett treonin van jelen/ a hp55-TNF-R receptorhoz való kötődési aktivitásukat megtartják, ugyanakkor azonban a hp75-TNF-R receptorhoz való kötődésüket csaknem teljesen elvesztik. Ezenkívül azt találtuk, hogy az ilyen hTNF-muteinek a hp55-TNF-R által közvetített biológiai aktivitást megtartják, a hp75-TNF-R receptorhoz azonban nem kötődnek. A találmányunk szerinti hTNF muteineket azonban nem korlátozzuk az ilyen típusu muteinekre. Találmányunk más típusu muteinekre is kiterjed, amelyek kizárólag a hp55-TNF-R receptorhoz kötődnek, azonban a funkcionális sejt-választ kiváltó kapacitásukat elvesztették.

Találmányunk humán p55-tumor nekrosis faktor receptorhoz /hp55-TNF-R/ szelektív kötődési affinitást mutató humán tumor nekrosis faktor muteinekre vonatkozik, amelyeket az jellemez, hogy

a humán tumor nekrozis faktor aminosav-szekvenciájá<sup>nak</sup> legalább a 86-helyzetében változást tartalmaznak, és pedig szerin-maradék helyett treonin van jelen.

A humán TNF- $\alpha$  aminosav-szekvenciáját az /I/ képleten tüntetjük fel. A fenti aminosav-szekvenciát Pennica és tsai /s.a./ irták le vagy Marmenout és tsai /s.a./ vagy Wang és tsai /s.a./ vagy Shirai és tsai /s.a./ közölték vagy az érett TNF- $\alpha$ -t kódoló pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$  plazmid /lásd 1a. és 1b. ábra és I. példa/ inzertjének nukleotid szekvenciája kódolta.

A fentiekben meghatározott hTNF muteinek a hTNF aminosav-szekvenciája egy vagy több további helyzetében is változásokat hordozhatnak, előnyösen egy vagy két további helyzetben, különösen a 29, 31, 32, 29 és 32, vagy 31 és 32 helyzetben. Ezekben a további helyzetekben bármely aminosav - előnyösen a természetben előforduló aminosav - jelen lehet. A 29-helyzetben előnyösen szerin, glicin vagy tirozin, különösen előnyösen szerin lehet jelen. A 31-helyzetben levő helyettesítések szempontjából a glutaminsav vagy aszparagin előnyös. A 32-helyzetben levő helyettesítések tekintetében a tirozin, triptofán vagy treonin, különösen a triptofán és treonin előnyös.

A találmányunk szerinti hTNF muteinek további olyan aminosav-helyettesítéseket is tartalmazhatnak, amelyek a p55-TNF-R receptorhoz való szelektív kötődési affinitást nem változtatják meg. A fehérjék és polipeptidek olyan aminosav-helyettesítései, amelyek a biológiai aktivitást lényegében nem változtatják meg, az irodalomból jólismertek [lásd pl. Neurath H. és Hill R.L.: "The Proteins", Academic Press, New York /1979/, különösen a 14. oldalon levő 6. ábra]. A leggyakoribb megfigyelt aminosav-

-helyettesítések az alábbiak: Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly és fordítva. A találmányunk szerinti hTNF muteinek továbbá "linker" szekvenciák által kódolt különböző aminosav-szekvenciákat tartalmazhatnak. Ezek a szekvenciák a hTNF muteinek kifejezésére felhasznált, a továbbiakban ismertetésre kerülő kifejező vektorok révén keletkezhetnek.

A találmányunk szerinti hTNF muteinek továbbá olyan specifikus szekvenciákat tartalmazhatnak, amelyek előnyösen affinitás hordozóanyagokhoz kötődnek. Az ilyen szekvenciák példaként a legalább két szomszédos hisztidin-maradékot tartalmazó szekvenciákat említjük meg /lásd 282 042 sz. közrebocsájtott európai szabadalmi bejelentés/. Az ilyen szekvenciák nitriloecetsav nikkell kelát gyantákhoz szelektíven kötődnek [Hochuli és Döbeli: Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, 748 /1987/; 253 303 sz. közrebocsájtott európai szabadalmi bejelentés]. Az ilyen specifikus szekvenciát tartalmazó hTNF muteinek a hTNF mutein aminosav szekvenciájának C-terminálisához vagy N-terminálisához vagy mindkét terminálisához kapcsolódhatnak.

A találmányunk szerinti hTNF muteinek különböző immunoglobulin nehéz láncu vagy könnyű láncu polipeptidekkel is kombinálhatók. Ez kimer hTNF mutein immunoglobulin polipeptidekhez vezet, amelyek in vivo hosszabb felezési idővel rendelkezhetnek. Hosszabb felezési időket tapasztaltunk pl. olyan kimer polipeptidek esetében, amelyek az emlős immunoglobulin nehéz láncu vagy könnyű láncu részéből konstans tartományának első két ~~tartományából~~ állnak [lásd Traunecker és tsai: Nature 331, 84-86 /1988/ és 394 827 sz. közre-

bocsájtott európai szabadalmi bejelentés].

A hTNF muteinek továbbá polimerekhez is kapcsolhatók /pl. 500-20.000 dalton molekulatömegű polietilén-glikol vagy poli-propilén-glikol/. Ez védett hTNF mutein kompozíciókhoz vezet, amelyek lényegében nem-immunogének lehetnek. A polimerek és polipeptidek kapcsolására számos módszer ismert és ezeket az irodalomban le is irták /lásd pl. 4 179 337 sz. amerikai egyesült államok-beli szabadalmi leírás/.

Különösen előnyös találmányunk szerinti hTNF muteinek az alábbiak: Thr<sup>86</sup>-TNF- $\alpha$ , Ser<sup>29</sup>-Thr<sup>86</sup>-TNF- $\alpha$ , Glu<sup>31</sup>-Thr<sup>86</sup>-TNF- $\alpha$ , Trp<sup>32</sup>-Thr<sup>86</sup>-TNF- $\alpha$ , Ser<sup>29</sup>-Trp<sup>32</sup>-Thr<sup>86</sup>-TNF- $\alpha$  vagy Asn<sup>31</sup>-Thr<sup>32</sup>-Thr<sup>86</sup>-TNF- $\alpha$ .

A találmányunk szerinti hTNF muteineket az irodalomból jól ismert módszerekkel állíthatjuk elő [Sambrook és tsai: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. kiadás, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA /1989/] vagy a következő bekezdések. A példákban leírt módon határozható meg, hogy az ilyen hTNF muteinek a p55-TNF-R receptorhoz szelektíven kötődnek-e vagy sem. A találmányunk szerinti hTNF muteinek alternatív módon az irodalomból ismert standard kémiai módszerekkel is szintetizálhatók; előnyösen szilárdfázisú módszereket alkalmazhatunk [lásd Merrifield módszerei: J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154 /1963/]. Találmányunk továbbá e muteinek sóira is kiterjed. A sók előállítására önmagukban ismert módszerekkel történik.

Feltételezésünk szerint a TNF-el összefüggő más betegségek és állapotok kezelésében általánosan használható az a stratégia, amely szerint a hasznos és nemkívánatos TNF- $\alpha$  aktivitásokat



az egyik vagy másik TNF-receptorhoz specifikusan kötődő vegyületek - pl. a találmányunk szerinti hTNF-muteinek - felhasználásával szétválasztjuk.

Találmányunk tárgya továbbá a fentiekben leírt hTNF-muteineket kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó DNS-szekvenciák. Az ilyen DNS-szekvenciák hTNF-t kódoló genom- vagy cDNS-szekvenciák-ból kiindulva, az irodalomban leírt /s.a./ módon, az in vitro mutagenézis ismert módszereivel alakíthatók ki [lásd pl. Sambrook és tsai /1989/]. Az ilyen mutagenézist a kívánt tulajdonságok megfelelő vizsgáló rendszerekben történő meghatározása végett tesztelhető nagyszámu mutáns termelése céljából véletlenszerű módszerrel, vagy egy adott DNS-szekvencia meghatározott helyén történő mutáció előidézése céljából u.n. hely-irányított mutagenézissel [lásd pl. Sambrook és tsai: /1989/, 15.51-15.113] vagy polimeráz lánc reakció felhasználásával [lásd pl. White és tsai: Trends in Genetics 5, 185-189 /1989/] végrehajtott mutagenézissel végezhetjük el.

A véletlenszerűen végzett mutagenézisnél alkalmazott egyik kémiai mutagén ágens a nátrium-biszulfit, amely a citozinmaradékot uracilmaradékká alakítja és ezáltal a "C"  $\longrightarrow$  "T" átmenethez vezet /nukleotidok standard rövidítése; a módszer tekintetében lásd pl. Shortle és Nathans, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2170-2174 /1978/ vagy Pine és Huang, Meth. Enzym. 154, 415-430 /1987/]. Ez a mutagén ágens csak az egyszálu DNS-re hat, míg a mutált cél DNS szekvencia kifejezése kettősszálu plazmid vektorral történik. A mutagenézisnél és kifejező vektoroknál az ujraklonozás többek között u.n. "phazmidok" alkalmazásával kerülhető el. Ezek vektorok, amelyek a replikáció plazmid eredetén kívül valamely

szálszerű fágból leszármaztatott replikáció eredetét is hordoznak. Az ilyen phazmidok példáulként a Stanssen és tsai által leirt [Nucleic Acids. Res. 17, 4441-4454 /1989/] pMa- és mPc-phazmidokat említjük meg. Ezen kifejező rendszer felhasználásával u.n. "hézag-duplex" szerkezetek alakíthatók ki [lásd továbbá Kramer és tsai: Nucl. Acids. Res. 12, 9441-9456 /1984/], amelyekben csak a TNF-t kódoló szekvencia /s.a./ van egyszálu konfigurációban és ezért a specifikus kémiai mutagén ágens számára hozzáférhető. A véletlenszerű mutagenézisben felhasznált "hézag-duplexek" a hely-specifikus mutagenézissel kapcsolatban Stanssen és tsai által /s.a./ leirt módon építhetők fel azzal a különbséggel, hogy a /-/szál ugyanazt az aktiv antibiotikum rezisztens gént tartalmazza mint a /+/szál. A hTNF $\alpha$ -t kódoló DNS-szekvenciában különböző restrikciós helyek felhasználásával a hézag szélessége változtatható. Az ilyen restrikciós helyek példáulként a ClaI-SalI helyeket /470 nukleotid/, BstXI-BstXI helyeket /237 nukleotid/ vagy StyI-StyI helyeket /68 nukleotid/ említjük meg. Az ilyen hézag-duplex összetétel<sup>ke</sup> ezután növekvő koncentrációju /4 M-ig/ biszulfittal kezelhetjük, majd számos dialízis lépésnek vethetjük alá [Shortle és Nathans /s.a./ által leirt módon]. Egy megfelelő prokarióta gazdasejtet ezután az irodalomból ismert és pl. Sambrook és tsai /s.a./ által leirt módszer<sup>ekkel</sup> ilyen phazmidokkal transzformálhatunk. Ebben az összefüggésben "megfelelő prokarióta gazdasejten" olyan gazdasejtet értünk, amely egy specifikus regeneráló funkciójában hiányos és ezért a replikáció alatt az uracil-maradék a DNS-ben megmarad; ez a gazdasejt továbbá a megfelelő mutált TNF kifejezésére képes. Az ilyen specifikus gazdasejtek az irodalomból ismertek, pl. E. coli törzsek, mint pl. E. Coli BW 313 [Kunkel T.A.: Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 82, 488-492 /1985/]. A keletkező klónokból screeneléssel megfelelő vizsgáló rendszerek segítségével kiválasztjuk azokat, amelyek a kívánt hTNF kifejezésére képesek. Így pl. eljárhatunk oly módon, hogy minden telepet mikrotiter-lemezen a releváns antibiotikumot tartalmazó megfelelő táptalajban inokulálunk. A sejteket lizozim hozzáadásával lizálhatjuk, majd szekvenciális fagyasztásos-felengedéssel ciklusokat hajtunk végre. A nukleinsavak kicsapása és centrifugálás után minden telep felülszóját közvetlenül a megfelelő vizsgálatoknak vethetjük alá, pl. a IIa. és IIb. vagy VIII. példában leírt módon, amelynek során élősejtek felületén vagy tisztított formában mérjük a p75-TNF-R és p55-TNF-R receptorhoz történő kötődést.

A mutáció specifikus helyeit pl. restriktációs fragmens analízissel határozhatjuk meg [lásd pl. Sambrook és tsai /s.a./]. Az ilyen fragmensek DNS-szekvenciájának meghatározásával a mutáció pontos helyzete meghatározható és ha az ilyen mutáció aminosav-cseréhez vezet, úgy az új aminosav a meghatározott DNS-szekvenciából leszármaztatható. A DNS szekvenciálást az irodalomból ismert módszerekkel végezhetjük el, pl. T7 polimeráz felhasználásával szuperspirális DNS-en a kereskedelembe beszerezhető szekvenciáló kit segítségével /Pharmacia, Uppsala, Svédország/.

Mint már említettük, egy adott DNS-szekvencia mutálására rendelkezésre álló másik lehetőség a "hely irányított mutagenézis". Az ilyen típusú mutagenézis széleskörűen használt stratégiáját Hutchinson és Adgell [J. Virol. 8, 181 /1971/] írták le; ennek lényege, hogy a kívánt nukleotid helyettesítést hordozó szintetikus oligonukleotidot valamely egyszáru DNS-szekvencia azon cél-tartományába építjük be, ahol a mutációt el kívánjuk

végezni [lásd pl. Smith Annual Rev. Genet. 19, 423 /1985/; javított módszerek vonatkozásában lásd Stanssen és tsai: 2-6. hivatkozás /1989/].

Egy ilyen előnyös módszert Stanssen és tsai /1989/ írtak le, amelynek során "hézagos duplex DNS"-t alkalmaznak a Kramer és tsai /1984/ által leírt módon [lásd fent és Kramer és Fritz: Methods in Enzimology, /1987/, Academic Press Inc. /USA/], azonban a mutációt tartalmazó szál kiválasztásához M13 funkcionális gének helyett antibiotikum rezisztens géneket alkalmazunk, a phasmid-technológián kívül [lásd továbbá Stanssen és tsai /1989/ /s.a./]. E rendszer előnye, hogy egymásután több mutagenézis ciklus elvégzésére képes anélkül, hogy a gént egy új mutagenézis vektorra át kellene vinni; a második mutagenézis ciklus csupán abban különbözik, hogy egy másik antibiotikum markert kell kiválasztani /Stanssen és tsai s.a./. Kontrollként a mutánsnak a vadtypusu TNF-é történő hely-specifikus visszamutagenézise alkalmazható. Ezenkívül a TNF génben egy restrikciós helyet létrehozó vagy megszüntető oligonukleotid alkalmazása esetén a mutáns nem csupán a hely-irányított mutagenézishez felhasznált oligonukleotiddé történő hibridizáció útján ellenőrizhető, hanem a restrikciós hely jelenléte vagy hiánya által is. Az aminosav-szekvenciában a vadtypusu aminosavak helyén bármely természetben előforduló aminosavat tartalmazó hTNF mutein készlet előállítása céljából egy oligonukleotid készletet alkalmazunk, amely a meghatározott helyzetekben minden lehetséges kodont tartalmaz.

Mint már említettük, egy adott DNS-szekvencia mutálásának további lehetősége a polimeráz lánc reakciót /PCR/ alkalmazó mutagenézis. A módszer elveit pl. White és tsai /1989/ ismertették,

míg javított módszereket pl. Innis és tsai irtak le [PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press Inc. /1990/].

A PCR nagymennyiségű, meghatározott hosszúságú és szekvenciájú specifikus DNS fragmens kis mennyiségű templát DNS-ből történő termelésére szolgáló in vitro módszer. A PCR a cél szekvencia ellentétes szálaihoz hibridizáló két oligonukleotid primer által szegélyezett DNS fragmens enzimikus amplifikációján alapul. A primerek orientációja olyan, hogy 3' végeik egymásfelé mutatnak. A templát hővel több ciklusban végzett denaturálása, a primereknek komplementer szekvenciáikhoz történő illesztése és az így átalakított primerek DNS polimerázzal végrehajtott kiterjesztése a PCR primerek 5' végei között levő szegmens amplifikációját eredményezi. Minthogy minden primer kiterjesztett terméke egy másik primer templátjaként szolgálhat, minden ciklus lényegében megkétszerezi az előző ciklusban termelt DNS fragmens mennyiségét. Minthogy a primerek a megsokszorozott termékbe fizikailag beépülnek s a primer 5' végei és a templát közötti hibás összeillesztések az amplifikáció hatékonyságát jelentős mértékben nem befolyásolják, a megsokszorozott szekvencia megváltoztatható és ezáltal a kívánt mutáció a megsokszorozott DNS-be beépíthető. A termofil *Thermus aquaticus* baktériumból izolált termotabil Taq DNS polimeráz felhasználásával a polimeráz denaturálódása elkerülhető; ez a denaturálódás mindeztideig minden egyes denaturálási lépés után enzim hozzáadását tette szükségessé. E fejlesztés segítségével a PCR számos egyszerű, hőmérséklet-cikluson alapuló berendezés felhasználásával automatizálható. Ezenkívül az amplifikációs reakció specifikussága oly módon növelhető, hogy a primer

beillesztésnél és kiterjesztésnél magasabb hőmérsékleteket alkalmazunk. A megnövelt specifikusság a megsokszorozott termékek összkitermelését azáltal javítja, hogy a nem célzott fragmensek között az enzimekért és primerekért folyó versengést minimumra csökkenti.

Az oligonukleotidok megtervezését és szintézisét az irodalomban ismert és pl. Sambrook és tsai /1989/ által leírt módon vagy a hely-irányított mutagenézissel kapcsolatban idézett irodalmi helyek valamelyikében leírtak szerint végezhetjük el.

A találmányunk szerinti hTNF muteint kódoló DNS-szekvencia létrehozása után a kifejezést a fentiekben leírt phasmid technológiával vagy az irodalomból jólismert bármely megfelelő prokarióta vagy eukarióta kifejező rendszer felhasználásával /lásd pl. Sambrook és tsai s.a./ végezhetjük el.

A kifejezést előnyösen prokarióta sejtekben végezhetjük el, így pl. az alábbi sejteket alkalmazhatjuk: *E. coli*, *Bacillus subtilis* stb., előnyösen *E. coli*, különösen *E. coli* K12 törzsek, pl. M15 [DZ 291, Villarejo és tsai: *J. Bacteriol.* 120, 466-474 /1974/], HB 101 [ATCC No. 33694], WK6 /Stranssens és tsai s.a./ vagy *E. coli* SG13009 [Gottesmann és tsai: *J. Bacteriol.* 148, 265-273 /1981/]. A találmányunk szerinti hTNF muteineket továbbá alacsonyabb vagy magasabb rendű eukarióta sejtekben is kifejezhetjük, így pl. élesztősejtekben /pl. *Saccharomyces*, *Pichia* stb./, szálszerű gombákban /pl. *Aspergillus* stb./ vagy sejtvonalakban /pl. kínai hörcsög petefészeksejtvonalakban stb./; a kifejezést előnyösen élesztősejtekben végezhetjük el [lásd: Sreekrishna és tsai: *Biochem.* 28, 4117-4125 /1989/; Hitzeman és tsai: *Nature* 293, 717-722 /1981/; 263 311 sz. európai közrebocsájtási irat].

A találmányunk szerinti hTNF muteinek az ilyen rendszerekben intracellulárisan vagy - a gén megfelelő adaptálása után - extracellulárisan fejeződnek ki [lásd Lermans és tsai: Gene 85, 99-108 /1989/].

Az E. coli-ban történő kifejezésre alkalmas vektorokat többek között az alábbi irodalmi helyeken irták le: [Sambrook és tsai /s.a./ vagy Fiers és tsai: "Proc. 8th Int. Biotechnology Symposium" [Soc. Franc. de Microbiol., Paris, (Durand és tsai kiadó), 680-697. oldal /1988/] vagy a pDS családhoz tartozó egy vagy több specifikus vektor [Bujard és tsai: Methods in Enzymology, kiadó: Wu és Grossmann, Academic Press, Inc., 155. kötet, 416-433 /1987/; Stüber és tsai: Immunological Methods, kiadó: Lefkovits és Pernis, Academic Press, Inc., IV. kötet, 121-152 /1990/], mint pl. pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$ (Thr86) /lásd I. példa/ vagy pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$ (Trp32Thr86) /lásd III. példa/ vagy pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$ (Ser29Thr86) vagy pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$ (Ser29Trp32Thr86) vagy pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$ (Asn31Thr32Thr86) vagy pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$ (Glu31Thr86) /lásd IV. példa/]. Minthogy ezekkel a specifikus pDS56/RBSII plazmidokkal specifikus szabályozható promotor/operátor elemeik és riboszómás megkötő helyeik révén magas szintű kifejezés érhető el, a plazmidok az E. coli sejtekben csak akkor tarthatók fenn, ha a promotor/operátor elem aktivitását a lac represszornak az operátorhoz történő kötődése represszálja. A promotor aktivitása a kívánt sejtsűrűségre IPTG hozzáadásával állítható vissza, amely a represszort inaktíválja és a promotort megtisztítja. Minthogy a legtöbb E. coli törzs nem rendelkezik az ilyen nagy kópiaszámú plazmidokban jelenlevő promotor szekvenciák funkciójának teljes represszállásához elegendő

represszor molekulával, az ilyen *E. coli* törzseket /pl. *E. coli* M15 vagy SGI3009/ a specifikus pDS56/RBSII plazmidokkal történő transzformálás előtt a lac represszort kódoló valamely plazmiddal /pl. pREP 4 - lásd 2a. és b. ábra/ transzformálni kell; ezután a plazmidok az *E. coli* sejtekben stabilan fenntarthatók. A pREP4 a lac represszor kódolásán kívül a pACYC184 plazmid [Chang és Cohen: *J. Bacteriol.* 134, 1141-1156 /1978/] egy tartományát is tartalmazza, amely a replikációhoz és a leánysejtekhez történő stabil transzmisszióhoz szükséges összes információt tartalmazza [további információk tekintetében lásd továbbá "System for high level production in *E. coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure function analysis" - Stüber és tsai: *Immunological Methods*, IV. kötet, 121-152. oldal, Lefkovits és Pernis /kiadók/, Academic Press, New York /1990/].

A gazdasejteknek vektorok által végzett, a fentiekben leírt transzformációját bármely szokásos módszerrel végrehajthatjuk [lásd pl. Sambrook és tsai /s.a./]. Prokarióta gazdasejtek /pl. *E. coli*/ esetében DNS felvételére alkalmas kompetens sejtek az exponenciális növekedési fázis után összegyűjtött, majd az ismert kalcium-kloridos módszerrel kezelt sejtekből állíthatók elő. A transzformáció a gazdasejtből történő protoplaszt képzés után vagy az irodalomból ismert és leírt más módszerekkel is elvégezhető [Sambrook és tsai /s.a./]. Ennek megfelelően valamely vektor - különösen a fentiekben leírt hTNF muteint kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó, prokarióta vagy alacsonyrendű eukarióta gazdasejtekben történő kifejezésre képes vektorok - és az ilyen vektorok által transzformált gazdasejtek - különösen prokarióta



gazdasejtek, pl. E. coli vagy alacsonyrendű eukarióta gazdasejtek - szintén találmányunk tárgyát képezik.

A kívánt kifejező vektort tartalmazó gazdaszervezeteket általában a növekedés szempontjából optimális körülmények között tenyésztjük. Prokarióta gazdasejtek esetében az exponenciális növekedés végén - amikor az időegységre vonatkoztatott sejtszám-növekedés lassul - a kívánt hTNF mutein kifejezését indukáljuk, azaz a kívánt hTNF muteint kódoló DNS-t átírjuk és az átírt mRNS-t lefordítjuk. Az indukciót oly módon végezhetjük el, hogy a táptalajhoz valamely induktort vagy derepresszort adunk vagy a fizikai paramétereket módosítjuk /pl. hőmérséklet változtatás/. A találmányunk előnyös kiviteli alakjait képező kifejező vektorokban a kifejezést a lac represszor ellenőrzi. A kifejező kontroll szekvenciát izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid /IPTG/ hozzáadásával derepresszáljuk és ezáltal a kívánt hTNF mutein szintézisét indukáljuk.

A transzformált gazdasejtek által fentiek szerint termelt találmányunk szerinti hTNF muteineket a fermentációs közegből nyerhetjük ki vagy a sejtek felnyitása után és/vagy a fehérje és peptid kémiában ismert bármely megfelelő extrakciós módszerrel izolálhatjuk. Így pl. az alábbi kinyerési módszerek alkalmazhatók: ammónium-szulfátos kicsapás, dialízis, ultraszűrés, gélszűrés vagy ioncserélő kromatografálás, gél elektroforézis, izoelektromos fókuszálás, affinitás kromatográfia, mint pl. immunoaffinitás kromatográfia, HPLC stb. Különösen előnyösnek bizonyultak az alábbi eljárások: ammónium-szulfátos ~~kicsapás~~ és/vagy polietilén-kicsapás, imines dialízis, affinitás kromatográfia, pl. fenil-agarózon, különösen fenil-sepharozon vagy ioncserélő kromatografálás, kü-

lönösen MONO-Q- és/vagy MONO-S-matrixon /Pharmacia, Uppsala, Svédország/ vagy különösen a Tavernier és tsai által leirt [J. Mol. Biol. 211, 493-501 /1901/] és az V. példában leirt módszer.

Találmányunk tárgya ennek megfelelően eljárás a fentiekben meghatározott hTNF muteinek előállítására oly módon, hogy valamely, a fentiekben leirt transzformált gazdasejtet megfelelő táptalajban tenyésztünk, a muteint a felülszó tenyészetből vagy magából a gazdasejtéből izoláljuk és a muteint kívánt esetben sóvá alakítjuk. A fenti eljárással előállított vegyületek ugyancsak találmányunk tárgyát képezik.

A találmányunk szerinti hTNF muteineket az jellemzi, hogy a humán p55-TNF-R receptorhoz szelektíven kötődnek. Ezt a tulajdonságot az irodalomból a kötődési affinitások mérésére ismert bármely módszerrel meghatározhatjuk. Így pl. a TNF és a találmányunk szerinti muteinek kötődését sejtenyészetekben olyan sejtek alkalmazásával határozzuk meg, amelyek a TNF receptorok két típusát különböző mértékben fejezik ki; ilyen sejtek pl. a Hep-2 sejtek, amelyek kizárólag a humán p55-TNF-R receptort fejezik ki vagy az U937 vagy HL60 sejtek, amelyek ezenkívül a humán p75-TNF-R receptort is kifejezik [Brockhaus és tsai: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 87, 3127-3131 /1990/; Hohmann és tsai: J. Biol. Chem. 264, 14927-14934 /1989/; Loetscher és tsai: /1990/; Dembic és tsai /1990/]. A kötődési affinitások természetesen közvetlenül, tisztított natív vagy rekombináns p55-TNF-R és p75-TNF-R felhasználásával, a példákban leirt módon vagy az ilyen receptorok megfelelő oldható analógjai alkalmazásával is meghatározhatók.

A jelen szabadalmi leírásban használt "humán p55-tumor nekrozis faktor receptorhoz történő szelektív kötődési affinitás" kifejezés azt jelenti, hogy a két TNF-receptorhoz irányuló kötődési affinitás közötti különbség a meghatározáshoz felhasznált vizsgálatok szerint olyan jelentős mértékű, hogy a találmányunk szerinti muteinek a vadtipusu TNF-hez hasonlóan a p55TNF-receptorokhoz szelektíven kötődnek, ugyanakkor azonban a hp75-TNF-R-hez történő kötődést funkcionálisan lényegében elvesztették. Pontosabb meghatározás szerint a példákban bemutatott vizsgálati rendszer vonatkozásában a fenti kifejezés azt jelenti, hogy a találmányunk szerinti specifikus hTNF mutein  $K_D$  értéke a rekombináns oldható hp75-TNF-R receptorral végzett in vitro kötődési teszt szerint legalább 10-szer és előnyösen legalább  $10^2$ -szer nagyobb mint a vadtipusu TNF- $\alpha$  megfelelő értéke, míg ugyanezen hTNF mutein  $K_D$  értéke a rekombináns oldható hp55-TNF-R receptorral végzett in vitro kötődési teszt szerint legfeljebb kétszerese a vadtipusu TNF- $\alpha$  megfelelő értékének. Megjegyezzük azonban, hogy a fenti specifikus  $K_D$  értékek csupán tájékoztató jellegűek és szabadalmunk oltalmi köre szempontjából semmilyen korlátozást nem jelentenek.

A találmányunk szerinti hTNF muteinek tumorelleses hatását az irodalomból ismert módszerekkel határozhatjuk meg.

A találmányunk szerinti hTNF muteineket orálisan, injekció vagy helyi uton felhasználásra kerülő készítmények formájában alkalmazhatjuk. A hatóanyag dózisát oly módon választjuk meg, hogy a hTNF mutein funkcióval kapcsolatos biológiai funkciót hatékonyan módosítsa.

Találmányunk tárgya továbbá gyógyászati készítmény, amely találmányunk szerinti hTNF muteineket és megfelelő inert

gyógyászati hordozóanyagokat tartalmaz. Bármely szokásos gyógyászati hordozóanyag felhasználható. E célra enterális, perkutáns vagy parenterális adagolásra alkalmas, szerves vagy szervetlen hordozóanyagok alkalmazhatók, pl. viz, zselatin, gumiarábikum, laktóz, keményítő, magnézium-sztearát, talkum, növényi olajok, polialkilénglikolok, vazelin stb. A találmányunk szerinti gyógyászati készítmények további hatóanyagokat is tartalmazhatnak. A készítmények ezenkívül más adalékanyagokat is tartalmazhatnak, pl. izesítő-, tartósító-, stabilizáló-, emulgeálószerket, puffereket stb. A készítmények a gyógyszergyártásnál használatos adalékanyagokat tartalmazhatnak.

A találmányunk szerinti gyógyászati készítmények bármely szokásos formában előállíthatók, pl.

- a/ orális adagolásra szolgáló szilárd formák, pl. tabletták, kapszulák, pilulák, porok, granulák stb.;
- b/ orális adagolásra szolgáló folyékony formák, pl. oldatok, szirupok, szuszpenziók, elixírek stb.;
- c/ parenterális adagolásra szolgáló készítmények, pl. steril oldatok, szuszpenziók vagy emulziók; és
- d/ helyi alkalmazásra szolgáló formák, pl. oldatok, szuszpenziók, kenőcsök, krémek, gélek, mikronizált porok, aeroszolok stb.

A gyógyászati készítmények sterilizálhatók és adjuvánsokat /pl. tartósító-, stabilizáló-, nedvesítő-, emulgeálószerket, az ozmózisnyomás változását előidéző sók és/vagy pufferek/ tartalmazhatnak.

A parenterális adagolásra szolgáló készítmények intravénásan vagy intramuszkulárisan befecskendezhető infúziós vagy injekciós oldatok lehetnek. Ezek a készítmények további gyógyászati

hatóanyagokat is tartalmazhatnak. A készítményekhez adalékanyagokat /pl. tartósító-, stabilizáló-, emulgeálószer, pufferek stb./ is adhatunk, a gyógyszergyártás szokásos módszereinek megfelelően.

Találmányunk tárgya továbbá eljárás gyógyászati készítmények előállítására oly módon, hogy valamely találmányunk szerinti vegyületet és kívánt esetben további gyógyászati hatóanyagokat nem-toxikus inert gyógyászatiilag kompatibilis hordozóanyagokkal összekeverünk és a keveréket galenikus formára hozzuk.

Találmányunk tárgya továbbá a találmányunk szerinti eljárással előállított vegyületek felhasználása gyógyászati készítmények előállítására.

Találmányunk tárgya továbbá a találmányunk szerinti hTNF muteinek ellen termelt antitestek. Az ilyen antitestek jólismert módon diagnosztikai vagy gyógyászati célokra és tisztítási módszereknél alkalmazhatók. Az antitesteket oly módon termeljük, hogy egy emlősbe vagy madárba a találmányunk szerinti hTNF mutein elleni antitest termelésének megindításához <sup>e)</sup>elgondó mennyiségű találmányunk szerinti hTNF muteint és gyógyászatiilag kompatibilis hordozóanyagot tartalmazó vakcinát fecskendezünk. Az e célra szükséges hTNF mutein mennyiség a szakember által jólismert vagy rutin kísérletekkel határozható meg. A jelen szabadalmi leírásban használt "gyógyászati hordozóanyag" kifejezés a humán gyógyászatban alkalmazható standard készítményekben vagy állati vakcinákban használatos tipikus adjuvánsokra vonatkozik.

A TNF potens pleiotrop citokin. Számos különböző aktivitása /pl. immun sejtek növekedési faktorának aktiválása, gyulladásoknál betöltött közvetítő szerep vagy az endotéliumban levő

specifikus gének induktora/ a gazdaszervezetnek fertőzésekkel vagy sérülésekkel szemben kifejtett védekezésében játszik szerepet. A TNF erős szisztémás toxicitást is mutat; a bakteriaemia káros hatásait és a bakteriális meningitis okozta szeptikus sokkot nagy mértékben endogén citokinek közvetítik és ezek között a TNF korai és fontos szerepet tölt be. Ezenkívül a TNF közvetlen citotoxikus aktivitásával szemben sok sejt és sejtvonal érzékeny. Állatkísérletek tanúsága szerint a TNF tumorelles hatásaiban különböző szisztémás hatások és celluláris toxicitás feltehetően kombinálódnak.

A fenti tények reális alapot szolgáltatnak a találmányunk szerinti hTNF muteineket felhasználó új gyógyászati stratégiák kidolgozására; ezek során a sok különböző hTNF aktivitás szétválasztásával a nemkívánatos toxikus hatásokat a kívánt aktivitásoktól különválasztjuk. Így pl. a találmányunk szerinti hTNF muteineket magas dózisokban tumorelles szerként alkalmazzuk; ezt a feltehetően alacsony szisztémás toxicitás teszi lehetővé és így módon a vadtypusu hTNF rákos betegekben történő felhasználhatóságát feltehetően igen nagy mértékben leszűkítő dóziskorlátozó toxicitás kiküszöbölhető. A találmányunk szerinti hTNF muteinek potenciális felhasználását azonban nem korlátozzuk a rák gyógyítására. Az 55kDa TNF receptor típusu specifikus gyógyszerek - pl. a találmányunk szerinti hTNF muteinek - minden olyan betegség kezelésében kedvezően alkalmazhatók, amelyben a TNF gazdaszervezet védekező faktorként bakteriális fertőzésekben [lásd pl. Kindler V. és tsai: CELL 56, 731-740 /1989/; Nakano Y. és tsai: J. Immunol. 144, 1935 /1990/] vagy gyulladásokban közvetítőként jótékony szerepet játszik. A TNF a cachexiában /leromlás/ is szerepet játszik [pl.

Beutler B. és Cerami /s.a./] és az alacsony szisztémás toxicitást mutató találmányunk szerinti TNF muteinek elhízás ellenes kezelésnél is alkalmazhatók. Még a túlzott mértékű TNF felszabadulás által kifejtett toxikus hatások /pl. szeptikus sokk vagy bakteriális meningitis/ is kedvezően kezelhetők 55kDA TNF receptor specifikus agonistákkal /pl. a találmányunk szerinti muteinekkal/ vagy TNF antagonistákkal képezett kombinációkkal.

A TNF új gyógyászati kezeléseiben fokozott szerepet játszik. E kezeléseik során az alacsony szisztémás toxicitással rendelkező és a számos különböző TNF aktivitás közül csupán néhányat kiváltó, p55-TNF-receptor típusu specifikus agonisták várhatóan jelentős előnyöket mutatnak a vad típusu TNF-el szemben; rövid összefoglalás az alábbi irodalmi helyen található: Tumor Necrosis Factors, The Molecules and their Emerging Role in Medicine, B. Beutler, kiadó: Raven Press /1992/, ISBN 0-88167-852-X. Ide tartoznak a TNF aktivitásai az alábbi területeken: endothelialis sejt homosztatikus tulajdonságok és neutrofil adhézió modulálása, szövet iszkémia és reperfüziós sérülés, osteoblasztok és osteoclastok csont reszorpcióban, növekedési faktorként sok sejten általában és hematopoiesisben, valamint metabolikus és táplálék hatások. A celluláris védekező rendszert biztosító specifikus gének indukciója /pl. a p55-TNFR ellenőrzés alatt levő Mn-superoxid dismutáz indukciója/ [Lewis és tsai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2830 /1991/; Tartaglia és tsai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9292 /1991/] vagy a TNF számos sejtben kifejtett közvetlen citotoxicitása egyaránt racionális alapot szolgáltat a receptor típusu specifikus TNF agonisták felhasználásával végzett új gyógyászati stratégiákhoz. A TNF a limfokin által aktivált killer

sejtek /LAK/ kialakításában növekedés/differenciáló faktorként vesz részt és úgy tűnik, hogy ez a TNF tumorellenes aktivitásában szerepet játszik.

Fontos tényező, hogy valamennyi fentemlitett aktivitás más rekombináns citokinekkal /pl. gamma-interferonnal/ kombinálva fokozható vagy módosítható.

Találmányunk további részleteit az alábbi példákban ismertetjük anélkül, hogy az oltalmi kört e példákra korlátoznánk.

Az alábbi rövidítéseket és szimbólumokat alkalmazzuk:  
B, E, H, S, Xb és X a BglI, EcoRI, HindIII, SallI, XbaI illetve XhoI restriktációs enzimek hasítási helyeit jelölik.

 jelentése a N250PSN250P29 szabályozható promotor/operátor elem;

 jelentése a RBSII, SphI szintetikus riboszómás kötődési hely;

 jelentése a TNF $\alpha$  /TNF $\alpha$ /, beta-laktamáz /bla/, kloramfenikol acetil transzferáz /cat/, lac represszor /lacI/ és neomicin foszfotranszferáz /neo/ génjei;

 jelentése a fág lambda t<sub>0</sub> transzkriptációs terminátora /t<sub>0</sub>/ és az E. coli rrnB operon T1 /T1/;

 jelentése a pBR322 és pREP4 /repl/ plazmid replikációs tartományai;

 jelentése a N250PSN250P29 és RBSII, SphI által ellenőrzött kódoló tartomány.

Az 1a. ábrán a pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$  plazmid sematikus rajzát tüntetjük fel.

Az 1b. ábra a pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$  plazmid teljes nukleotid szekvenciáját tartalmazza. Ebben a szekvenciában a restriktációs enzimeknek az 1a. ábrán feltüntetett felismerő szek-



venciáit megjelöltük. A bemutatott aminosav-szekvencia az érett  $\text{TNF}\alpha$  /157 aminosav/ hárombetűs kódban feltüntetett aminosav-szekvenciája.

A 2a. ábrán a pREP4 plazmid sematikus rajzát tüntetjük fel.

A 2b. ábra a pREP4 plazmid teljes nukleotid szekvenciáját tartalmazza. Ebben a szekvenciában a restrikciós enzimeknek a 2a. ábrán feltüntetett felismerő szekvenciáit bejelöltük.

A 3. ábrán a  $\text{Thr}^{86}$ - $\text{TNF}\alpha$  képletű  $\text{TNF}\alpha$  muteint kódoló EcoRI-HindIII fragmens készítését tüntetjük fel.

A 4. ábra a pDS56/RBSII,SphI- $\text{TNF}\alpha$ /Trp32/ plazmid 1 fragmensének nukleotid szekvenciáját tartalmazza.

Az 5. ábrán a pDS56/RBSII,SphI- $\text{TNF}\alpha$ /Ser29/ plazmid 1 fragmensének nukleotid szekvenciáját tüntetjük fel.

A 6. ábra pDS56/RBSII,SphI- $\text{TNF}\alpha$ /Ser29Trp32/ plazmid 1 fragmensének nukleotid szekvenciáját tartalmazza.

A 7. ábrán a vadtypusu humán  $\text{TNF}\alpha$  és  $\text{Thr}^{86}$ ,  $\text{Trp}^{32}$ - $\text{Thr}^{86}$  és  $\text{Ser}^{29}$ - $\text{Trp}^{32}$ - $\text{Thr}^{86}$  muteinek rekombináns humán p-75 és p-55  $\text{TNF-R}$  receptorokon mutatott kompetitív kötődését mutatjuk be.

Rekombináns humán p-75 $\text{TNF-R-IgG}\gamma 3$  fúziós fehérjével /A lemez/ és rekombináns humán p-55 $\text{TNF-R-IgG}\gamma 3$  fúziós fehérjével /B lemez/ bevont mikrotiter lemezeket különböző koncentrációju vadtypusu  $\text{TNF}\alpha$  /töltött körök/,  $\text{Thr}^{86}$  mutein /üres körök/,  $\text{Trp}^{32}$ - $\text{Thr}^{86}$  mutein /üres négyzetek/ és  $\text{Ser}^{29}$ - $\text{Trp}^{32}$ - $\text{Thr}^{86}$  mutein /üres háromszögek/ jelenlétében, radioaktív jelzett humán  $\text{TNF}\alpha$ -al inkubálunk. A szobahőmérsékleten megkötött radioaktivitást 3 óra múlva gamma-számlálóban megszámláljuk.

A 8. ábrán a vadtypusu humán  $\text{TNF}\alpha$  és  $\text{Ser}^{29}$ - $\text{Thr}^{86}$ ,

Glu<sup>31</sup>-Thr<sup>86</sup> és Asn<sup>31</sup>-Thr<sup>32</sup>-Thr<sup>86</sup> muteinek rekombináns humán p-75 és p-55TNF-R receptorokon mutatott kompetitív kötődését mutatjuk be.

Rekombináns humán p-75TNF-R-IgG<sub>γ</sub>3 fúziós fehérjével /A ábra/ és rekombináns humán p-55TNF-R-IgG<sub>γ</sub>3 fúziós fehérjével /B ábra/ bevont mikrotiter lemezeket különböző koncentrációju vad-típusu TNF $\alpha$  /töltött körök/, Ser<sup>29</sup>-Thr<sup>86</sup> mutein /<sup>üres</sup>nyitott körök/, Asn<sup>31</sup>-Thr<sup>32</sup>-Thr<sup>86</sup> mutein /üres négyzetek/ és Glu<sup>31</sup>-Thr<sup>86</sup> mutein /üres háromszögek/ jelenlétében, radioaktív jelzett TNF $\alpha$ -al inkubálunk. A szobahőmérsékleten megkötött radioaktivitást 3 óra múlva gamma-számlálóval megszámláljuk.

Az alábbiakban a szilárd anyagokra szilárd anyagok keverékeiben, folyékony anyagokra folyadékokban és szilárd anyagokra folyadékokban megadott százalékos értékek tömeg/tömeg, térfogat/térfogat illetve tömeg/térfogat százalékban értendők.

#### I. példa

##### Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$ plazmid előállítása

pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$  plazmid

A találmányunk szerinti különböző TNF $\alpha$  muteinek előállításánál TNF $\alpha$  gén forrásként a pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$  humán TNF $\alpha$  kifejező plazmid /lásd 1. ábra/ szolgál. A transzformált E. coli M15 /pREP4; pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$ / törzset a Budapesti Szerződés értelmében <sup>(a)</sup>szabadalmi célokra a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH /DNM/ intézetben /Braunschweig, Németország/ 1991. szeptember 8-án 6713 számon deponáltuk.

TNF $\alpha$  gén mutagenézise PCR felhasználásával

Két PCR reakciót végzünk a pDS56RBSII, SphI-TNF $\alpha$  /1. ábra/ plazmiddal, mint templát DNS-el, Perkin-Elmer Cetus GeneAmp<sup>R</sup> DNS

amplifikáló reagens kit felhasználásával, az AmpliTaq<sup>R</sup> rekombináns Taq DNS polimerázzal /lásd 3. ábra/.

Az I. reakciót a 17/F 5'-GGCGTATCACGAGGCCCTTTCG-3'; [a 17/F primer a pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$  plazmid 3949-3970 nukleotidjeit tartalmazza] és a 29/M22 5-GTAGGTGACGGCGATGCGGCTGATGGT-3'; [a 29/M22 primer olyan nukleotidokat tartalmaz, amelyek a pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$  plazmid 378-352 nukleotidjaival komplementerek] primerekkel végezzük el.

A II. reakciót a 29/MR1 5'-CAGACCAAGGTCAACCTCCTC-3'; [a 29/MR1 primer a pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$  plazmid 379-399 nukleotidjeit tartalmazza] és a 17/0 5'-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3'; [a 17/0 primer olyan nukleotideket tartalmaz, amelyek a pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$  plazmid 748-727 nukleotidjeivel komplementerek] primerekkel végezzük el.

Egy tipikus kísérletben 10  $\mu$ l templát DNS-t /10 ng/, 5-5  $\mu$ l-t a két primerből /100-100 pmól/, 16  $\mu$ l dNTP keveréket /1,25 mM dATP, dGTP, dCTP és dTTP/, 10  $\mu$ l 10x reakció puffert /100 mM trisz-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> és 0,1 % zselatin/, 1  $\mu$ l /5 egység/ AmpliTaq<sup>R</sup> DNS polimerázt és 53  $\mu$ l vizet Eppendorp csőben összekeverünk és 80 ml ásványolajat /Perkin-Elmer Cetus/ rétegezzük föléje. A csöveket DNS termikus ciklizálóba /TRIO-Thermoblock, Biometra/ visszük át és egy percen át 94 °C-on tartjuk; 35 ciklus előtt a DNS megolvasztását /1 perc 94 °C/, a primerek anneálását /1 perc 50 °C/ és a primerek kiterjesztését /3 perc 72 °C/ végezzük el. Ezután további 2 percen át 72 °C-on tartjuk, a reakcióelegyeket szobahőmérsékletre hűtjük és kloroformmal extraháljuk. A vizes fázisban levő DNS-t etanolal kicsapjuk és 6 %-os poliakrilamid gélben elektroforézisnek

vetjük alá [Sambrook és tsai, /1989/]. A DNS-t etidium-bromiddal megfestjük, majd az I. és II. fragmenst /lásd 3. ábra/ a gélről izoláljuk és tisztítjuk /Sambrook és tsai, 1989/.

A Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  muteint kódoló DNS fragmens készítése

Az I. és II. fragmenst enzimesen foszforilezzük, majd egymással ligáljuk /Sambrook és tsai, 1989/. A ligáz hővel történő inaktiválása és EcoRI és HindIII restrikciós enzimekkel végzett emésztés után DNS-t 6 %-os poliakrilamid gélben elektroforézisnek vetjük alá. Ezután a DNS-t etidium-bromiddal megfestjük, majd az EcoRI-HindIII A fragmenst /lásd 3. ábra/ a gélről izoláljuk és tisztítjuk /s.a./.

A Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  muteint kódoló plazmid készítése

A EcoRI-HindIII A fragmenst standard módszerekkel /Sambrook és tsai, 1989/ az EcoRI-HindIII által felnyitott pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$  plazmidba beillesztjük és ily módon a pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$  /Thr<sup>86</sup>/ plazmidot alakítjuk ki. A DNS plazmidot elkészítjük /Birnboim és tsai, 1979/ és a TNF $\alpha$  muteint kódoló tartomány identitását a kétszálu DNS szekvenciálásával igazoljuk /Sambrook és tsai, 1989/.

Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  termelése

A pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$ /Thr<sup>86</sup>/ plazmidot standard módszerekkel /s.a./ olyan E. coli M15 sejtekbe transzformáljuk, amelyek a pREP4 plazmidot már tartalmazzák. A transzformált sejteket 37 °C-on LB-táptalajban 100 mg/l ampicillint és 25 mg/liter kanamicint tartalmazó LB táptalajban /Sambrook és tsai, 1989/ tenyésztjük. 600 nm optikai sűrűség mellett kb. 0,7-1,0 IPTG-t adunk hozzá, végső koncentráció 2 mM. Az elegyet további 2,5-5 órán át 37 °C-on tartjuk, majd a sejteket centrifugálással összegyűjtjük.

II. példaGlu<sup>31</sup>-TNF $\alpha$  és Asn<sup>31</sup>,Thr<sup>32</sup>-TNF $\alpha$  előállítás

## Elvi megfontolások

A Glu<sup>31</sup>-TNF $\alpha$  és Asn<sup>31</sup>,Thr<sup>32</sup>-TNF $\alpha$  muteineket az I. példában a Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  készítése kapcsán részletesen leírt eljárással állítjuk elő. Ezért a fenti TNF $\alpha$  muteinek előállításával kapcsolatban csak az I. és II. PCR reakciókban felhasznált primereket írjuk részletesen le. Ezenkívül a különböző TNF $\alpha$  muteineket kódoló kifejező plazmidok nevét tüntetjük fel.

Glu<sup>31</sup>-TNF $\alpha$  előállítása

A PCR I. reakciót a 17/F [5'-GGCGTATCACGAGGCCCTTTTCG-3'; a 17/F primer a pDS56/RBSII, PshI-TNF $\alpha$  plazmid 3949-3970 nukleotidjeit tartalmazza] és a 21/M5 [5-ATTGGCCCGCTCGTTCAGCCACTGGAGCTGCCCCCTC-3'; a 21/M5 primer olyan nukleotidokat tartalmaz, amelyek a pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$  plazmid 219-184 nukleotidjaival komplementerek; a mutált bázisokat aláhúztuk] primerekkel végezzük el.

A PCR II. reakciót a 21/MR [5'-GCCCTCCTGGCCAATGGCGTGG-3'; a 21/MR primer a pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$  plazmid 220-241 nukleotidjeit tartalmazza] és 17/O [5'-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3'; a 17/O primer olyan nukleotidokat tartalmaz, amelyek a pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$  plazmid 748-727 nukleotidjeivel komplementerek/ primerekkel végezzük el.

A kapott pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$ /Glu<sup>31</sup>/ kifejező plazmidot a Glu<sup>31</sup>-TNF $\alpha$  előállításánál és a pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$ /Glu<sup>31</sup>Thr<sup>86</sup>/ plazmid felépítésénél használjuk fel /lásd IV. példa/.

Asn<sup>31</sup>,Thr<sup>32</sup>-TNF $\alpha$  előállítása

A PCR I. reakciót a 17/F [5'-GGCGTATCACGAGGCCCTTTTCG-3'; a 17/F primer a pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$  plazmid 3949-3970 nukleotidjeit tartalmazza] és a 21/M6 [5-ATTGGCAGTGTGTTTCAGCCACTGGAGCTGCCCCCTC-

-3'; a 21/M6 primer olyan nukleotideket tartalmaz, amelyek a pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$  plazmid 219-184 nukleotidjeivel komplementerek; a mutált bázisokat aláhúztuk] primerekkel végezzük el.

A PCR II. reakciót a 21/MR [5'-GCCCTCCTGGCCAATGGCGTGG-3'; a 21/MR primer a pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$  plazmid 220-241 nukleotidjeit tartalmazza] és a 17/0 [5'-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3'; a 17/0 primer olyan nukleotideket tartalmaz, amelyek a pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$  plazmid 748-727 nukleotidjeivel komplementerek] primerekkel végezzük el.

A kapott pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$ /Asn<sup>31</sup>Thr<sup>32</sup>/ kifejező plazmidot az Asn<sup>31</sup>Thr<sup>32</sup>-TNF $\alpha$  előállításánál és a pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$ /Asn<sup>31</sup>Thr<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>/ plazmid felépítésénél használjuk fel /lásd IV. példa/.

### III. példa

#### Trp<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$ előállítása

Elvi megfontolások

A Trp<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  előállításánál a pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$ /Trp<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>/ plazmidot építjük fel és ezután ezt használjuk fel E. coli-ban a Trp<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  mutein előállítására.

A pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$ /Trp<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>/ plazmid felépítése

Az I. és II. példában leírt valamennyi plazmid a BglI enzim restrikciós enzim számára ugyanazt a két helyet tartalmazza mint a pDS56/RBSII, SphI-TNF $\alpha$  plazmid /lásd 1. ábra/. E két hely közül az egyik a beta-laktamáz génben, míg a másik a TNF $\alpha$  génben helyezkedik el. Az utóbbi a TNF $\alpha$  kódoló tartományát két részre választja szét; az egyik rész a TNF $\alpha$  1-36 aminosavát, míg a másik a TNF $\alpha$  37-157 aminosavát kódolja /lásd 1b. ábra/.

Az pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$ /Trp32Thr86/ plazmid felépítése céljából DNS 1 és 2 fragmenst standard módszerekkel állítunk elő /Sambrook és tsai, 1989/. Az 1 fragmens /szekvenciákat lásd 4. ábra/ a pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$ /Trp32/ plazmid kis BglI fragmense, amely szabályozható promotort és a Trp<sup>32</sup>-TNF $\alpha$  36-ig terjedő aminosavainak kódoló tartományát tartalmazza. A 2 fragmens a pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$ /Thr86/ plazmid nagy BglI fragmense, amely a Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  37-nél kezdődő aminosavainak kódoló tartományát és a plazmid replikációs tartományát tartalmazza. Az 1 fragmenst és az enzimatikusan defoszforilezett 2 fragmenst egymással ligáljuk /Sambrook és tsai, 1989/ és ily módon a pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$ -/Trp32Thr86/ plazmidot alakítjuk ki.

Az M15/pREP4;pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$ /Trp32/ sejteket a Budapesti Megállapodásnak megfelelően szabadalmi célokra a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH /DSM/ intézetben /Braunschweig, Németország/ 1990. november 19-én DSM 6241 számon deponáltuk.

#### Trp<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$ termelése

A pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$ /Trp32Thr86/ plazmidot standard módszerekkel /s.a./ olyan E. coli M15 sejtekbe transzformáljuk, amelyek a pREP4 plazmidot már tartalmazzák. A transzformált sejteket 37 °C-on 100 mg/liter ampicillint és 25 mg/liter kanamicint tartalmazó LB táptalajban tenyésztjük. 600 nm optikai sűrűség mellett kb. 0,7-1,0 IPTG-t adunk hozzá 2 mM végső koncentrációban. Az elegyet további 2,5-5 órán át 37 °C-on tartjuk, majd a sejteket centrifugálással összegyűjtjük.

#### IV. példa

Ser<sup>29</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$ , Ser<sup>29</sup>Trp<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$ , Glu<sup>31</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$

és Asn<sup>31</sup>Thr<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  előállítása

## Elvi megfontolások

A Ser<sup>29</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$ , Ser<sup>29</sup>Trp<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$ , Glu<sup>31</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  és Asn<sup>31</sup>Thr<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  TNF $\alpha$  muteineket a III. példában a Trp<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  előállításával kapcsolatban részletesen leírt eljárással állítjuk elő. Ezért a fenti TNF $\alpha$  muteinek előállításánál csak a III. példa 1 fragmensének megfelelő DNS fragmenseket ismertetjük részletesen. Ezenkívül a különböző TNF $\alpha$  muteineket kódoló kifejező plazmidok nevét adjuk meg.

Ser<sup>29</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  előállítása

Az 1 fragmens /a szekvenciákat az 5. ábrán tüntetjük fel/ a pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$ /Ser29/ plazmid kis BglI fragmense, amely a szabályozható promotort és a Ser<sup>29</sup>TNF $\alpha$  36-ig terjedő aminosavainak kódoló tartományát tartalmazza. Az 1 fragmenst és az enzimatisz defoszforilezett 2 fragmenst /lásd III. példa/ egymással ligáljuk /Sambrook és tsai, 1989/ és a keletkező pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$ - /Ser29Thr86/ plazmidot használjuk fel E. coli-ban a Ser<sup>29</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  termelésére.

Az M15 [pREP4;pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$ /Ser29/] sejteket a Budapesti Megállapodásnak megfelelően szabadalmi célokra a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH /DSM/ intézetnél /Braunschweig, Németország/ 1990. november 19-én DSM 6240 számon helyeztük letétbe.

Ser<sup>29</sup>Trp<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  előállítása

Az 1 fragmens /a szekvenciákat a 6. ábrán tüntetjük fel/ a pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$ /Ser29Trp32/ plazmid kis BglI fragmense, amely a szabályozható promotort és a Ser<sup>29</sup>Trp<sup>32</sup>-TNF $\alpha$  36-ig terjedő aminosavainak kódoló tartományát tartalmazza. Az 1 fragmenst és az



enzimátikusan defoszforilezett 2 fragmenst /lásd III. ábra/ egymással ligáljuk /Sambrook és tsai, 1989/ és a képződő pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$ /Ser<sup>29</sup>Trp<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>/ plazmidot használjuk fel E. coli-ban a Ser<sup>29</sup>Trp<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  termelésére.

#### Glu<sup>31</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$ előállítás

Az 1 fragmens a pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$ /Glu<sup>31</sup>/ plazmid kis BglI fragmense, amely a szabályozható promotort és a Glu<sup>31</sup>-TNF $\alpha$  36-ig terjedő aminosavainak kódoló tartományát tartalmazza. Az 1 fragmenst és az enzimatikusan defoszforilezett 2 fragmenst /lásd III. példa/ egymással ligáljuk /Sambrook és tsai, 1989/ és a képződő pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$ /Glu<sup>31</sup>Thr<sup>86</sup>/ plazmidot használjuk fel E. coli-ban a Glu<sup>31</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  termelésére.

#### Asn<sup>31</sup>Thr<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$ előállítás

Az 1 fragmens a pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$ /Asn<sup>31</sup>Thr<sup>32</sup>/ plazmid kis BglI fragmense, amely a szabályozható promotort és az Asn<sup>31</sup>Thr<sup>32</sup>-TNF $\alpha$  36-ig terjedő aminosavainak kódoló tartományát tartalmazza. Az 1 fragmenst és az enzimatikusan defoszforilezett 2 fragmenst /lásd III. ábra/ egymással ligáljuk /Sambrook és tsai, 1989/ és a képződő pDS56/RBSII,SphI-TNF $\alpha$ /Asn<sup>31</sup>Thr<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>/ plazmidot használjuk fel E. coli-ban az Asn<sup>31</sup>Thr<sup>32</sup>Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  termelésére.

#### V. példa

##### Humán TNF $\alpha$ muteinek tisztítása

A fentiekben leírt módon transzformált és indukált E. coli sejtek egyéjszakás tenyészetéből 1 litert centrifugálással összegyűjtünk és 20 ml 50 mM trisz-ben /pH 7,2; 200 mM KCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % glicerín/ ujrasszuspendálunk. A sejteket présen 20 000 psi nyomáson feltörjük. Ezután centrifugálással /70 000 x g, 30 perc, 4 °C/ derítjük, majd 30 %-os végső koncentrációig szilárd ammónium-

-szulfátot adunk hozzá. Az oldatot szobahőmérsékleten egyórán át keverjük, majd 10 000 x g mellett /20 perc, 4°C/ centrifugáljuk. A felülusztót 0,45  $\mu$ m-os szűrőn átszűrjük és ammónium-szulfátban 70 %-ra állítjuk be. A kiváló fehérjéket centrifugálással összegyűjtjük, 20 ml 20 mM trisz-ben /pH 9,0/ oldjuk és ugyanezzel a pufferrel szemben egy éjjelen át 4 °C-on dializáljuk. A dializált minták 1 ml-es aliquot részeit 20 mM trisz-el /pH 9,0/ kiegyensúlyozott MonoQ oszlopra /HR 5/5, LKB-Pharmacia/ visszük fel és lineáris nátrium-klorid gradiens szerint /0-400 mM, 20 mM trisz-ben, pH 9,0/ 0,5 ml/perc csepegési sebesség mellett eluáljuk. 0,5 ml-es frakciókat gyűjtünk össze és TNF $\alpha$  muteinek jelenlétére nátrium-lauril-szulfát-poliakrilamid gél elektroforézissel /SDS-PAGE/ meg-elemezzük. A pozitív frakciókat összegyűjtjük, 20 mM 2-morfolino-etánszulfonsavval /MES; pH 6,0/ szemben dializáljuk és 20 mM MES-el /pH 6,0/ kiegyensúlyozott MonoS oszlopra /HR 5/5, LKB Pharmacia/ visszük fel. A fehérjéket lineáris nátrium-klorid gradiens szerint /0-400 mM, 20 mM MES-ben, pH 6/ 0,5 ml/perc csepegési sebesség mellett eluáljuk. Az elektroforetikusan tiszta fehérjeként értékelt különböző TNF $\alpha$  muteineket 250 mM és 350 mM nátrium-klorid között eluáljuk. Foszfáttal pufferolt nátrium-klorid-oldattal /PBS/ szemben végzett dialízis után a fehérje koncentrációt BCA fehérje meghatározással /Pierce Chemical Company/ meghatározzuk; standardként vadtipusu humán TNF $\alpha$ -t alkalmazunk.

#### VI. példa

Humán TNF $\alpha$  és muteinek kompetitív kötődése rekombináns humán p75-TNF-R és p55-TNF-R receptorokhoz

A kompetitív kötődés meghatározása céljából mikrotiter lemezeket rekombináns humán p75-TNF-R-humán IgG $\gamma$ 3 és p55-TNF-R-

-humán IgG $\gamma$ 3 fúziós fehérjék PBS-el készült, ~~oldataival~~ 0,3  $\mu$ g/ml illetve 0,1  $\mu$ g/ml oldataival bevonunk /100  $\mu$ l/mélyedés, egy éjjelen át 4 °C-on/ [Loetscher H. és tsai: J. Biol. Chem. 266, 18324-18329 /1991/; Lesslauer W. és tsai: Eur. J. Immunol. 21, 2883-2886 /1991/]. Ezután blokkoló pufferrel /50 mM trisz pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,02 % NaN<sub>3</sub>, 1 % zsirmentesített tejpor/ blokkoljuk, majd a mikrotiter lemezeket PBS-el mossuk és 10 ng/ml humán <sup>125</sup>I-TNF- $\alpha$ -al /jodogén módszerrel kb. 30  $\mu$ Ci/ $\mu$ g fajlagos aktivitásig jelzett; Pierce Chemical Company/ különböző mutein-koncentráció mellett inkubáljuk. A térfogat mélyedésenként 100  $\mu$ l és minden koncentrációból három meghatározást végzünk. Szobahőmérsékleten 3 órán át állni hagyjuk, majd a mélyedéseket PBS-el alaposan mossuk és g-számlálóban számláljuk.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás a humán p55-tumor nekrozis faktor receptor-hoz szelektív kötődési affinitást mutató humán tumor nekrozis faktor mutein vagy gyógyászatilag alkalmas sói előállítására, amely muteint az jellemez, hogy a humán tumor nekrozis faktor aminosav szekvenciájában legalább azt a változtatást tartalmazza, hogy a 86<sup>th</sup> helyzetben szerin maradék helyett treonin van jelen, azzal j e l l e m e z v e , hogy a fenti muteint kódoló DNS szekvenciát tartalmazó kifejező vektorral transzformált gazdasejtet megfelelő táptalajban tenyésztünk, a muteint a tenyészet felüluszból vagy magából a gazdasejtből izoláljuk és kívánt esetben a muteint gyógyászatilag alkalmas sóvá alakítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e , hogy olyan muteint állítunk elő, amelynek aminosav szekvenciája egy vagy több további helyzetben, előnyösen egy vagy két további helyzetben változtatást tartalmaz.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e , hogy olyan muteint állítunk elő, amelyben a humán tumor nekrozis faktor aminosav szekvenciájának a 29 és 86; 31 és 86; 32 és 86; 29, 32 és 86 vagy 31, 32 és 86 helyzetben változtatást tartalmaz.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e , hogy Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$ , Ser<sup>29</sup>-Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$ , Glu<sup>31</sup>-Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$ , Trp<sup>32</sup>-Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$ , Ser<sup>29</sup>-Trp<sup>32</sup>-Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  vagy Asn<sup>31</sup>-Thr<sup>32</sup>-Thr<sup>86</sup>-TNF $\alpha$  muteint állítunk elő.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e , hogy gazdasejtként valamely pro-

karióta vagy alacsonyrendű eukarióta gazdasejtet alkalmazunk.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e ,  
hogy gazdasejtként valamely E. coli törzset alkalmazunk.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás,  
azzal j e l l e m e z v e , hogy kifejező vektorként valamely,  
a pDS családba tartozó vektort alkalmazunk.

8. Eljárás gyógyászati készítmények előállítására, azzal  
j e l l e m e z v e , hogy valamely, az 1-7. igénypontok bár-  
melyike szerinti eljárással előállított vegyületet és kívánt eset-  
ben további gyógyászati hatóanyagot nem-toxikus, inert, kompatibi-  
lis gyógyászati hordozóanyagokkal összekeverünk és a keveréket  
galenikus formára hozzuk.

9. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárással  
előállított vegyületek felhasználása a 8. igénypont szerinti gyó-  
gyászati készítmények előállítására.

10. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárással  
előállított valamely vegyületet kódoló DNS szekvenciát tartalmazó  
DNS szekvencia.

11. Vektor, különösen prokarióta vagy alacsonyrendű  
eukarióta gazdasejtben történő kifejezésre szolgáló vektor, azzal  
j e l l e m e z v e , hogy a 10. igénypont szerinti DNS szek-  
venciát tartalmaz.

12. Gazdasejt, különösen prokarióta vagy alacsonyrendű  
eukarióta gazdasejt, azzal j e l l e m e z v e , hogy valamely,  
a 11. igénypont szerinti vektorral transzformálva van.

13. A 12. igénypont szerinti gazdasejt, azzal j e l -  
l e m e z v e , hogy valamely E. coli törzs.

A meghatalmazott:  
Dr. Tóth-Urbán László

1093 Budapest, Központár u. 24. I. 11/a  
Adószám: 41462056-1  
OTP számlaszám: 21844000000000000000  
14541-5

36 oldal  
+ 13 oldal  
49 oldal

843/93

# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

16050

16/1

69790

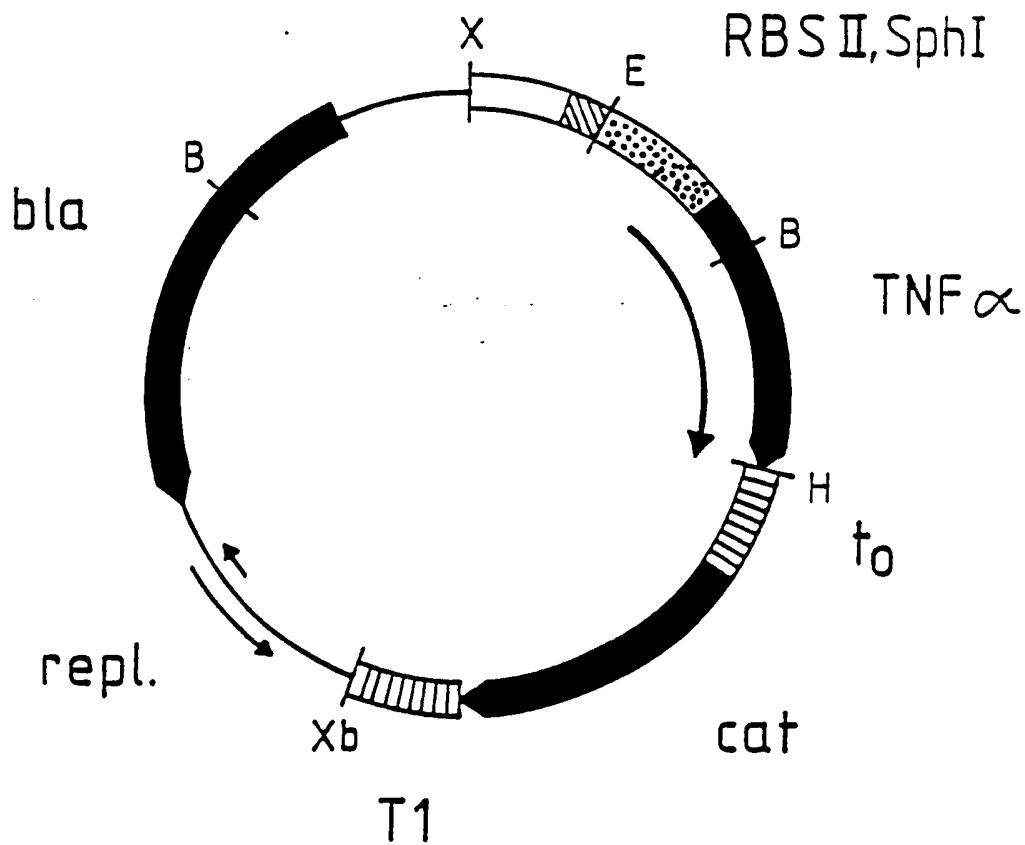
1 10  
VAL ARG SER SER SER ARG THR PRO SER ASP LYS PRO VAL ALA HIS  
20 30  
VAL VAL ALA ASN PRO GLN ALA GLU GLY GLN LEU GLN TRP LEU ASN  
40  
ARG ARG ALA ASN ALA LEU LEU ALA ASN GLY VAL GLU LEU ARG ASP  
50 60  
ASN GLN LEU VAL VAL PRO SER GLU GLY LEU TYR LEU ILE TYR SER  
70  
GLN VAL LEU PHE LYS GLY GLN GLY CYS PRO SER THR HIS VAL LEU  
80 90  
LEU THR HIS THR ILE SER ARG ILE ALA VAL SER TYR GLN THR LYS  
100  
VAL ASN LEU LEU SER ALA ILE LYS SER PRO CYS GLN ARG GLU THR  
110 120  
PRO GLU GLY ALA GLU ALA LYS PRO TRP TYR GLU PRO ILE TYR LEU  
130  
GLY GLY VAL PHE GLN LEU GLU LYS GLY ASP ARG LEU SER ALA GLU  
140 150  
ILE ASN ARG PRO ASP TYR LEU ASP PHE ALA GLU SER GLY GLN VAL  
157  
TYR PHE GLY ILE ILE ALA LEU

(I)

Dr. Tóth-Urbán László,  
ügyvéd  
1093 Budapest, Könyvtár u. 21. I. 11/a  
Adószám: 47462056-1-01  
OTP számlaszám: 218-98055  
14541-5

KÖZZÉTÉTEL  
PÉLDÁNY

N250PSN250P29



1a. ábra

## 1b. ábra

XhoI

1 CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCCGA TAACAATTAT

EcoRI

51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG

101 AGGAGAAATT AAGCATGGTC AGATCATCTT CTGGAACCCC GAGTGACAAG  
Val ArgSerSerS erArgThrPr oSerAspLys  
1 11

151 CCTGTAGCCC ATGTTGTGCG GAACCTCAA GCTGAGGGGC AGCTCCAGTG  
ProValAlaH isValValAl aAsnProGln AlaGluGlyG lnLeuGlnTr  
21

BglI

201 GCTGAACCGC CGGGCCAATG CCCTCCTGGC CAATGGCGTG GAGCTGAGAG  
pLeuAsnArg ArgAlaAsnA laLeuLeuAl aAsnGlyVal GluLeuArgA  
31 41

251 ATAACCAGCT GGTGGTGCCA TCAGAGGGCC TGTACCTCAT CTACTCCCAG  
spAsnGlnLe uValValPro SerGluGlyL euTyrLeuIl eTyrSerGln  
51 61

301 GTCCTCTTCA AGGGCCAAGG CTGCCCCCTCC ACCCATGTGC TCCTCACCCA  
ValLeuPheL ysGlyGlnGl yCysProSer ThrHisValL euLeuThrHi  
71

351 CACCATCAGC CGCATCGCCG TCTCCTACCA GACCAAGGTC AACCTCCTCT  
sThrIleSer ArgIleAlaV alSerTyrGl nThrLysVal AsnLeuLeuS  
81 91

401 CTGCCATCAA GAGCCCCCTGC CAGAGGGAGA CCCCAGAGGG GGCTGAGGCC  
erAlaIleLy sSerProCys GlnArgGluT hrProGluGl yAlaGluAla  
101 111

451 AAGCCCTGGT ATGAGCCCAT CTATCTGGGA GGGGTCTTCC AGCTGGAGAA  
LysProTrpT yrGluProIl eTyrLeuGly GlyValPheG lnLeuGluLy  
121

501 GGGTGACCGA CTCAGCGCTG AGATCAATCG GCCCGACTAT CTCGACTTTG  
sGlyAspArg LeuSerAlaG luIleAsnAr gProAspTyr LeuAspPheA  
131 141

551 CCGAGTCTGG GCAGGTCTAC TTTGGGATCA TTGCCCTGTG AGGAGGACGA  
laGluSerGl yGlnValTyr PheGlyIleI leAlaLeu  
151 157

601 ACATCCAACC TTCCCAAACG CCTCCCCTGC CCCAATCCCT TTATTACCCC

651 CTCCTTCAGA CACCCTCAAC CTCTTCTGGC TCAAAAAGAG AATTGGGGGC

HindIII

701 TTAGGGTCGG AACCCAAGCT TGGACTCCTG TTGATAGATC CAGTAATGAC

751 CTCAGAACTC CATCTGGATT TGTTCAGAAC GCTCGGTTGC CGCCGGGCGT

Dr. Tóth Urbán László

1093 Budapest, 11/a  
Adószám: 41402056-1-01  
OTP számlaszám: 218-98055  
14541-5



## 1b. ábra folytatása

801 TTTTATTGG TGAGAATCCA AGCTAGCTTG GCGAGATTTT CAGGAGCTAA  
 851 GGAAGCTAAA ATGGAGAAAA AAATCACTGG ATATACCACC GTTGATATAT  
 901 CCCAATGGCA TCGTAAAGAA CATTTTGAGG CATTTTCAGTC AGTTGCTCAA  
 951 TGTACCTATA ACCAGACCGT TCAGCTGGAT ATTACGGCCT TTTTAAAGAC  
 1001 CGTAAAGAAA AATAAGCACA AGTTTATCC GGCCTTTATT CACATTCTTG  
 1051 CCCGCCGTGAT GAATGCTCAT CCGGAATTTT GTATGGCAAT GAAAGACGGT  
 1101 GAGCTGGTGA TATGGGATAG TGTTCACCCT TGTTACACCG TTTTCCATGA  
 1151 GCAAACGTAA ACGTTTTCAT CGCTCTGGAG TGAATACCAC GACGATTTCC  
 1201 GGCAGTTTCT ACACATATAT TCGCAAGATG TGGCGTGTTA CCGTGAAAAC  
 1251 CTGGCCTATT TCCCTAAAGG GTTTATTGAG AATATGTTTT TCGTCTCAGC  
 1301 CAATCCCTGG GTGAGTTTCA CCAGTTTGA TTAAACGTG GCCAATATGG  
 1351 ACAACTTCTT CGCCCCCGTT TTCACCATGG GCAAATATTA TACGCAAGGC  
 1401 GACAAGGTGC TGATGCCGCT GCGGATTCAG GTTCATCATG CCGTCTGTGA  
 1451 TGGCTTCCAT GTCCGCAGAA TGCTTAATGA ATTACAACAG TACTGCCGAT  
 1501 AGTGGCAGGG CGGGGCGTAA TTTTTTAAAG GCAGTTATTG GTGCCCTTAA  
 1551 ACGCCTGGGG TAATGACTCT CTAGCTTGAG GCATCAAATA AAACGAAAGG  
 1601 CTCAGTCGAA AGACTGGGCC TTTCGTTTTA TCTGTGTTT GTCCGTGAAC  
  
 1651 GCTCTCCTGA GTAGGACAAA TCCGCCGCTC TAGAGCTGCC TCGCGCGTTT  
 1701 CCGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA  
 1751 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG  
 1801 TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG  
 1851 CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT  
 1901 ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TCGTAAGGA  
 1951 GAAAATACCG CATCAGGCGC TCTCCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTGCTG  
 2001 CGCTCGGTCT GTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT  
 2051 AATACGGTGA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG  
 2101 CAAAAGGCCA GAAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG

XbaI

Dr. Tóth Urbán László

ügyvéd

1093 Budapest, Széchenyi u. 11/a

Adószám: 41462058-1-01

OTP számlaszám: 218-98055

14541-5

## 1b. ábra folytatása

2151 TTTTTCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC  
2201 AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC  
2251 CCCCTGGAAG CTCCTCTGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC  
2301 GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCAATG  
2351 CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTGTTTCGC TCCAAGCTGG  
2401 GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT  
2451 AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC  
2501 AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA  
2551 CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA  
2601 TTGGTATCTT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG  
2651 TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG  
2701 TTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT  
2751 TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTAA  
2801 AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT  
2851 TAAATTAAAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT  
2901 TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT  
2951 CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGCTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA  
3001 CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG  
3051 CGAGACCCAC GCTCACCAGC TCCAGATTAA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC  
BglI  
3101 CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCTGTC AACTTTATCC GCCTCCATCC  
3151 AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT  
3201 AGTTTGCGCA ACGTTGTGTC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC  
3251 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG  
3301 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTAGCTC CTTCCGGTCT  
3351 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT  
3401 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAGTGTTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT  
3451 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG

Dr. Tóth-Urbán László

gyógyász

1093 Budapest, Központi utca 11/a

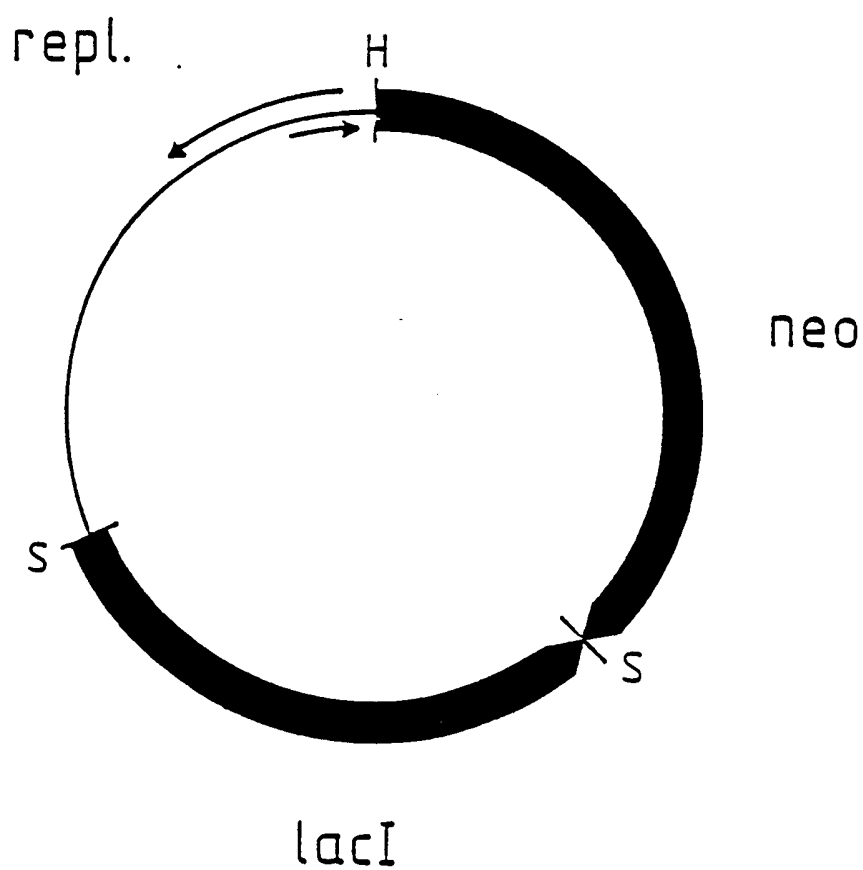
Adószám: 4142056-1-01

OTP számlaszám: 218-98055

14541-5

## 1b. ábra folytatása

3501 CGACCGAGTT GCTCTGCCCC GCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA  
3551 TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTTG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA  
3601 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTGAT GTAACCCACT  
3651 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG  
3701 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA  
3751 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC  
3801 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTTA  
3851 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC  
3901 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACTA TAAAAATAGG  
3951 CGTATCACGA GGCCCTTTTCG TCTTCAC



2a. ábra

## 2b. ábra

HindIII

1 AAGCTTCACG CTGCCGCAAG CACTCAGGGC GCAAGGGCTG CTAAAGGAAG  
51 CGGAACACGT AGAAAGCCAG TCCGCAGAAA CGGTGCTGAC CCCGGATGAA  
101 TGTCAGCTAC TGGGCTATCT GGACAAGGGA AAACGCAAGC GCAAAGAGAA  
151 AGCAGGTAGC TTGCAGTGGG CTTACATGGC GATAGCTAGA CTGGGCGGTT  
201 TTATGGACAG CAAGCGAACC GGAATTGCCA GCTGGGGCGC CCTCTGGTAA  
251 GGTGGAAG CCCTGCAAAG TAACTGGAT GGCTTTCTTG CCGCCAAGGA  
301 TCTGATGGCG CAGGGGATCA AGATCTGATC AAGAGACAGG ATGACGGTCG  
351 TTTCGCATGC TTGAACAAGA TGGATTGCAC GCAGGTTCTC CGGCCGCTTG  
401 GGTGGAGAGG CTATTCGGCT ATGACTGGGC ACAACAGACA ATCGGCTGCT  
451 CTGATGCCGC CGTGTCCCG CTGTCAGCGC AGGGGCGCCC GGTCTTTTTT  
501 GTCAAGACCG ACCTGTCCGG TGCCCTGAAT GAACTGCAGG ACGAGGCAGC  
551 GCGGCTATCG TGGCTGGCCA CGACGGGCGT TCCTTGCGCA GCTGTGCTCG  
601 ACGTGTTCAC TGAAGCGGA AGGGACTGGC TGCTATTGGG CGAAGTGCCG  
651 GGGCAGGATC TCCTGTATC TCACCTTGCT COTGCCGAGA AAGTATCCAT  
701 CATGGCTGAT GCAATGCCGC GGCTGCATAC GCTTGATCCG GCTACCTGCC  
751 CATTCGACCA CCAAGCGAAA CATCGCATCG AGCGAGCAGC TACTCGGATG  
801 GAAGCCGGTC TTGTCGATCA GGATGATCTG GACGAAGAGC ATCAGGGGCT  
851 CGCGCCAGCC GAACTGTTTG CCAGGCTCAA GGCGCGCATG CCCGACGGCG  
901 AGGATCTCGT CGTGACCCAT GCGATGCCT GCTTGCCGAA TATCATGGTG  
951 GAAAATGGCC GCTTTTCTGG ATTCATCGAC TGTGGCCGGC TGGGTGTGGC  
1001 GGACCGCTAT CAGGACATAG CGTTGGCTAC CCGTGATATT GCTGAAGAGC  
1051 TTGGCGGCGA ATGGGCTGAC CGCTTCCTCG TGCTTTACGG TATCGCCGCT  
1101 CCCGATTGCG AGCGCATCGC CTTCTATCGC CTTCTTGACG AGTTCTTCTG  
1151 AGCGGGACTC TGGGGTTGGA AATGACCGAC CAAGCGACGC CCAACCTGCC  
1201 ATCAGGAGAT TTCGATTCCA CCGCCGCCIT CTATGAAAGG TTGGGCTTCG  
1251 GAATCGTTTT CCGGACGCC GGCTGGATGA TCCTCCAGCG CGGGGATCTC  
1301 ATGCTGGAGT TCTTCGCCCA CCCC GGCTC GATCCCCTCG CGAGTTGGTT

Dr. Tóth-Urbán László

1093 Budapest, ~~Adószáma~~ 1093, ~~Adószáma~~ 1093, 11/a  
Adószám: 1093056-1093  
OTP számlaszám: 218-98055  
14541-5

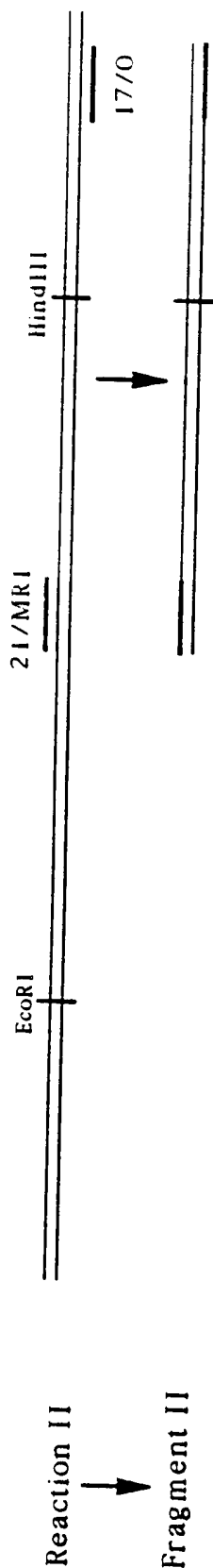
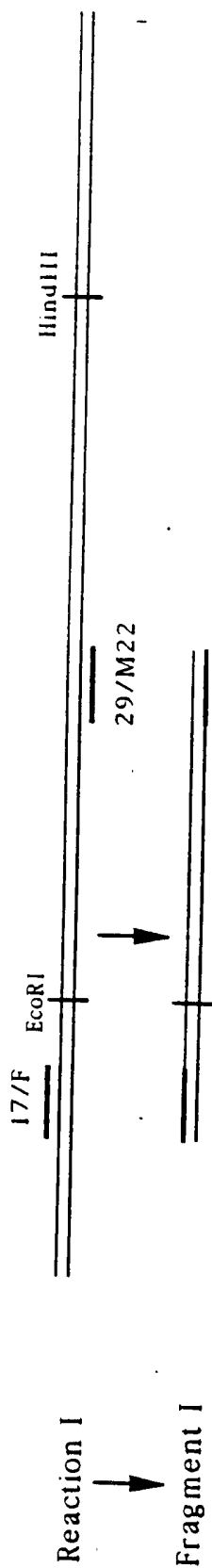
## 2b. ábra folytatása

1351 CAGCTGCTGC CTGAGGCTGG ACGACCTCGC GGAGTTCTAC CGGCAGTGCA  
 1401 AATCCGTCGG CATCCAGGAA ACCAGCAGCG GCTATCCGCG CATCCATGCC  
 1451 CCCGAAGTGC AGGAGTGGGG AGGCACGATG GCCGCTTTGG TCGACAATTC  
 1501 GCGCTAACTT ACATTAATTG CGTTGCGCTC ACTGCCCCGT TTCCAGTCCG  
 1551 GAAACCTGTC GTGCCAGCTG CATTAATGAA TCGGCCAACG CGCGGGGAGA  
 1601 GGCGGTTTGC GTATTGGGCG CCAGGGTGGT TTTTCTTTTC ACCAGTGAGA  
 1651 CGGGCAACAG CTGATTGCCC TTCACCGCCT GGCCCTGAGA GAGTTGCAGC  
 1701 AAGCGGTCCA CGCTGGTTTG CCCCAGCAGG CGAAAATCCT GTTTGATGGT  
 1751 GGTTAACGGC GGGATATAAC ATGAGCTGTC TTCGGTATCG TCGTATCCCA  
 1801 CTACCGAGAT ATCCGCACCA ACGCGCAGCC CGGACTCGGT AATGGCGCGC  
 1851 ATTGCGCCCA GCGCCATCTG ATCGTTGGCA ACCAGCATCG CAGTGGGAAC  
 1901 GATGCCCTCA TTCAGCATTT GCATGGTTTG TTGAAAACCG GACATGGCAC  
 1951 TCCAGTCGCC TTCCCGTTCC GCTATCGGCT GAATTGATT GCCAGTGAGA  
 2001 TATTTATGCC AGCCAGCCAG ACGCAGACGC GCCGAGACAG AACTTAATGG  
 2051 GCCCGCTAAC AGCGCGATTT GCTGGTGACC CAATGCGACC AGATGCTCCA  
 2101 CGCCCAGTCG CGTACCGTCT TCATGGGAGA AAATAATACT GTTGATGGGT  
 2151 GTCTGGTCAG AGACATCAAG AAATAACGCC GGAACATTAG TGCAGGCAGC  
 2201 TTCCACAGCA ATGGCATCCT GGTATCCAG CGGATAGTTA ATGATCAGCC  
 2251 CACTGACGCG TTGCGCGAGA AGATTGTGCA CCGCCGCTTT ACAGGCTTCG  
 2301 ACGCCGCTTC GTTCTACCAT CGACACCACC ACGCTGGCAC CCAGTTGATC  
 2351 GGCGCGAGAT TTAATCGCCG CGACAATTIG CGACGGCGCG TGCAGGGCCA  
 2401 GACTGGAGGT GGCAACGCCA ATCAGCAACG ACTGTTTGCC CGCCAGTTGT  
 2451 TGTGCCACGC GGTGCGGAAT GTAATTCAGC TCCGCCATCG CCGCTTCCAC  
 2501 TTTTCCCGC GTTTCCGAG AAACGTGGCT GGCCTGGTTC ACCACGCGGG  
 2551 AAACGGTCTG ATAAGAGACA CCGGCATACT CTGCGACATC GTATAACGTT  
 2601 ACTGGTTTCA CATTCAACAC CCTGAATTGA CTCTCTTCCG GCGCTATCA  
 2651 TGCCATACCG CGAAAGGTTT TCGCCCATTC GATGGTGTC ACGTAAATGC

## 2b. ábra folytatása

SalI

2701 ATGCCGCTTC GCCTTCGCGC GCGAATTGTC GACCCTGTCC CTCCTGTTCA  
 2751 GCTACTGACG GGGTGGTGCG TAACGGCAAA AGCACCGCCG GACATCAGCG  
 2801 CTAGCGGAGT GTATACTGGC TTAGCTATGTT GGCCTGATG AGGGTGTGAG  
 2851 TGAAGTGCTT CATGTGGCAG GAGAAAAAAG GCTGCACCGG TCGTTCAGCA  
 2901 GAATATGTGA TACAGGATAT ATTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTAC  
 2951 GCTCGGTCGT TCGACTGCGG CGAGCGGAAA TGGCTTACGA ACGGGGCGGA  
 3001 GATTTCTCTGG AAGATGCCAG GAAGATACTT AACAGGGAAG TGAGAGGGCC  
 3051 GCGGCAAAGC CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACA AGCATCACGA  
 3101 AATCTGACGC TCAAATCAGT GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT  
 3151 ACCAGGCGTT TCCCCTGGCG GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCTGCCT  
 3201 TTCGGTTTAC CGGTGTCAAT CCCCTGTTAT GGCCGCGTTT GTCTCAITTC  
 3251 ACGCCTGACA CTCAGTTCCG GGTAGGCAGT TCGCTCCAAG CTGGACTGTA  
 3301 TGCACGAACC CCCCGTTTCAG TCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACAT  
 3351 CGTCTTGAGT CCAACCCGGA AAGACATGCA AAAGCACCAC TGGCAGCAGC  
 3401 CACTGGTAAT TGATTTAGAG GAGTTAGTCT TGAAGTCATG CGCCGGTTAA  
 3451 GGCTAAACTG AAAGGACAAG TTTTGGTGAC TGCGCTCCTC CAAGCCAGTT  
 3501 ACCTCGGTTT AAAGAGTTGG TAGCTCAGAG AACCTTCGAA AAACCGCCCT  
 3551 GCAAGGCGGT TTTTTCGTTT TCAGAGCAAG AGATTACGCG CAGACCAAAA  
 3601 CGATCTCAAG AAGATCATCT TATTAATCAG ATAAAATATT TCTAGATTTT  
 3651 AGTGCAATTT ATCTCTCAA ATGTAGCACC TGAAGTCAGC CCCATACGAT  
 3701 ATAAGTTGTT AATTCTCATG TTTGACAGCT TATCATCGAT



3. ábra





## 4. ábra

BglI  
3102 GGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC  
3151 AGTCTATTAA TTGTTGCCCG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT  
3201 AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTACGCTC  
3251 GTCGTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG  
3301 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCCGGTCT  
3351 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT  
3401 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAGTGTTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT  
3451 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG  
3501 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA  
3551 TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA  
3601 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT  
3651 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG  
3701 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGA ATAAGGGCGA  
3751 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC  
3801 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTTA  
3851 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTCCAC  
3901 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG  
3951 CGTATCACGA GGCCCTTTCG TCTTCAC-

XhoI  
1 -CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT

EcoRI  
51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG  
101 AGGAGAAATT AAGCATGGTC AGATCATCTT CTCGAACCCC GAGTGACAAG  
Val ArgSerSerS erArgThrPr oSerAspLys  
1 11

151 CCTGTAGCCC ATGTTGTAGC AAACCCTCAA GCTGAGGGGC AGCTCCAGTG  
ProValAlaH isValValAl aAsnProGln AlaGluGlyG lnLeuGlnTr  
21

BglI  
201 GCTGAACCGC TGGGCCAATG CCCTCCTGGC  
pLeuAsnArg TrpAlaAsnA laLeu  
31 36

5. ábra

BglI

3102 GGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC

3151 AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT

3201 AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTACCGCTC

3251 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TCCCAACGA TCAAGGCGAG

3301 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTGGTTCCT

3351 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT

3401 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAGTGTTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT

3451 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCCG

3501 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA CCGGATAATA CCGCGCCACA

3551 TAGCAGAACT TAAAAGTGC TCATCATGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA

3601 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTGGAT GTAACCCACT

3651 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG

3701 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGA ATAAGGGCGA

3751 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC

3801 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTTA

3851 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC

3901 CTGACGTCTA AGAAACCAAT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG

3951 CGTATCACGA GGCCCTTTTCG TCTTCAC-

XhoI

1 -CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT

EcoRI

51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG

101 AGGAGAAATT AAGCATGGTC AGATCATCTT CTCGAACCCC GAGTGACAAG  
Val ArgSerSerS erArgThrPr oSerAspLys  
1 11

151 CCTGTAGCCC ATGTTGTAGC AAACCCTCAA GCTGAGGGGC AGCTCCAGTG  
ProValAlaH isValValAl aAsnProGln AlaGluGlyG lnLeuGlnTr  
21

BglI

201 GTCCAACCGC CGGGCCAATG CCCTCCTGGC  
pSerAsnArg ArgAlaAsnA laLeu  
31 36

Dr. Fehér Urbán László /

ügyvéd  
1093 Budapest, Rákóczi út 4. I. 11/a  
Adószám: 41462056-1-01  
OTP számlaszám: 218-98055  
14541-5

6. ábra

BglI

3102 GGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC

3151 AGTCTATTA TTTGTTGCCG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT

3201 AGTTTGCGCA ACGTTGTTC CATTCGTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC

3251 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG

3301 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTGGGTCTC

3351 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT

3401 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAATGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT

3451 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG

3501 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA

3551 TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTTG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA

3601 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTGAT GTAACCCACT

3651 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG

3701 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGA ATAAGGGCGA

3751 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC

3801 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA

3851 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCGA AAAGTGCCAC

3901 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTACCTA TAAAAATAGG

3951 CGTATCACGA GGCCCTTTTCG TCTTCAC-

XhoI

1 -CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT

EcoRI

51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG

101 AGGAGAAATT AAGCATGGTC AGATCATCTT CTCGAACCCC GAGTGACAAG

Val ArgSerSerS erArgThrPr oSerAspLys

1 11

151 CCTGTAGCCC ATGTTGTAGC AAACCCTCAA GCTGAGGGGC AGCTCCAGTG

ProValAlaH isValValAl aAsnProGln AlaGluGlyG lnLeuGlnTr

21

BglI

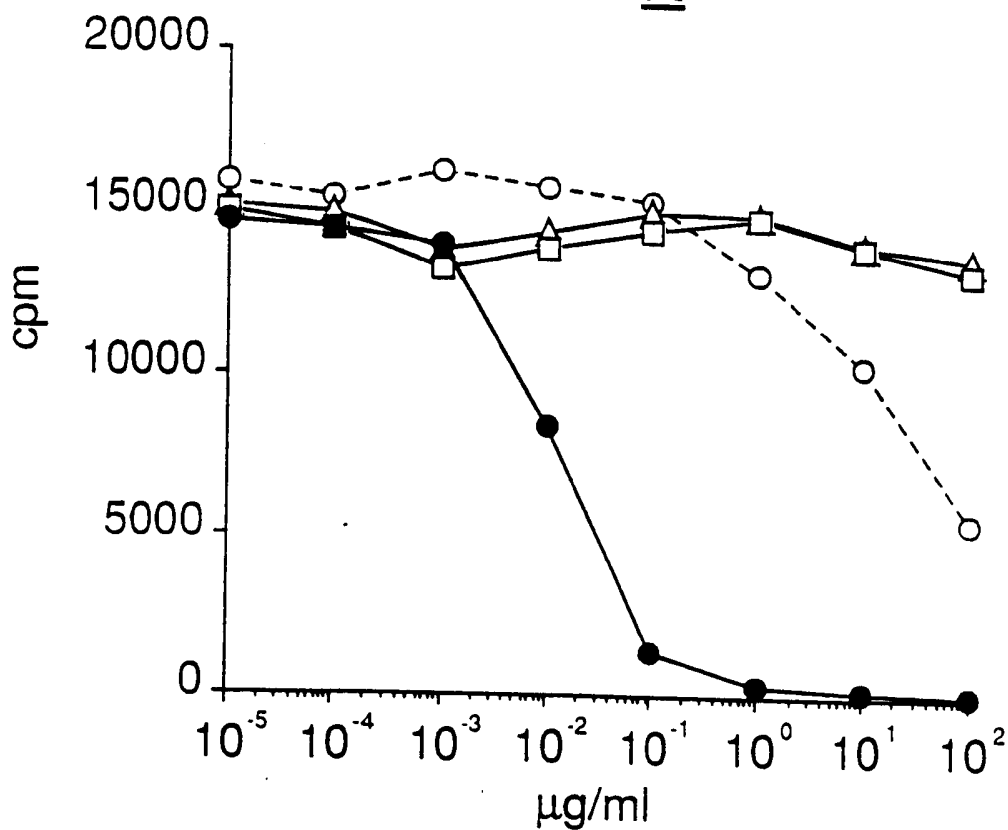
201 GTCCAACCGC TGGGCCAATG CCCTCCTGGC

pSerAsnArg TrpAlaAsnA laLeu

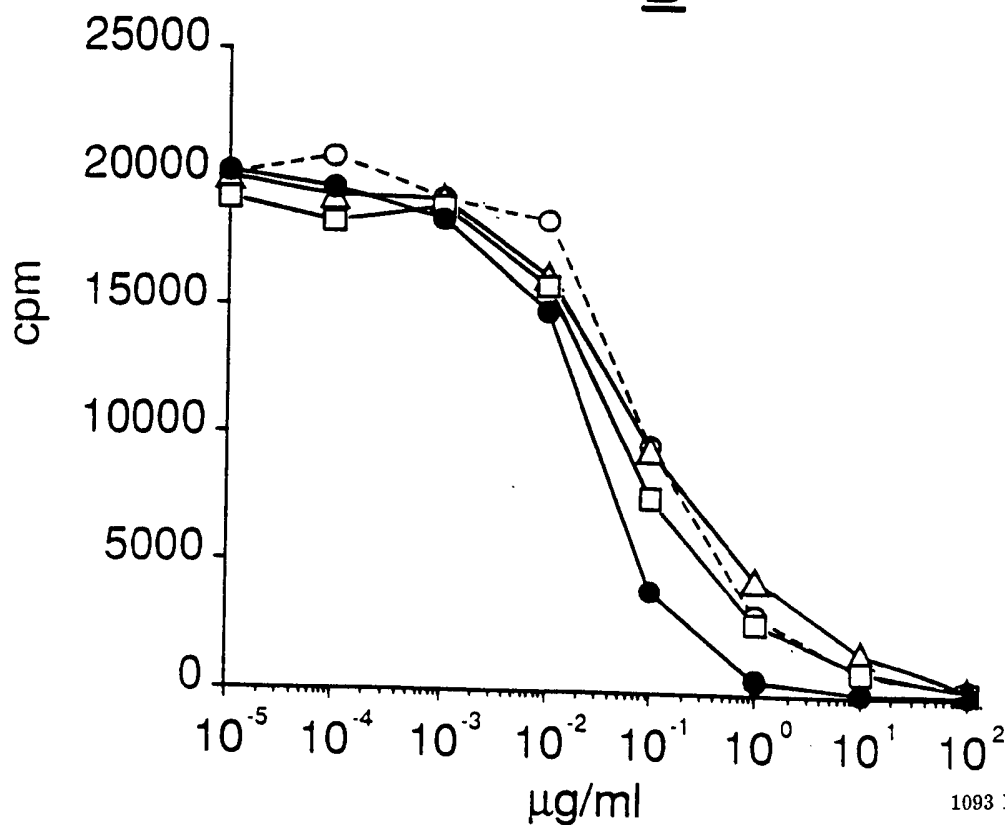
31 36

7. ábra

**A**



**B**



Dr. Földi-Urbán László

ügyvéd  
1093 Budapest, Rákóczi út 24. I. 11/a  
Adószám: 41462056-1-01

OTP számlaszám: 218-98055  
14541-5

8. ábra

