

P 0 1 0 3 6 0 1 HÍZÓSEJTEK DEGRANULÁCIÓJÁT GÁTLÓ HIBRID PROTEIN
ÉS ALKALMAZÁSA

KIVONAT

A találmány szerinti hibrid protein

- i) egy önmagában ismert proteinből, amely önmagában ismert módon hízósejtekhez és/vagy bazofil sejtekhez kötődik és/vagy amelyeket hízósejtek és/vagy bazofil sejtek felvesznek, és
- ii) egy önmagában ismert proteázból, amely a hízósejtek és/vagy bazofil sejtek kiválasztószervének egy vagy több proteinjét hasítja,

áll vagy azokat tartalmazza.

A találmány tárgyköréhez tartozik továbbá a fenti hibrid protein alkalmazása hízósejtek degranulációjának gátlására.

ülendő ábra: Ø

TR

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

**P 0103601 HÍZÓSEJTEK DEGRANULÁCIÓJÁT GÁTLÓ HIBRID PROTEIN
ÉS ALKALMAZÁSA**

A2

A találmány hízósejtek degranulációját gátló hibrid proteinre és alkalmazására vonatkozik.

Azonnali típusú allergiás reakciókra az jellemző, hogy az érintett betegekben allergiát kiváltó anyagokkal (így pollennel, háztartási porban lévő atkákkal vagy állati szőrökkel) szemben IgE-típusú antitestek képződtek. Ezek az antitestek nem csak a véráramban keringenek, hanem kötődnek olyan szöveti sejtekhez is, amelyeknek a plazmamembránban az IgE-molekula egy részére, az Fc-fragmentumra vonatkozó specifikus receptora van [Fishman, A., Lorberboum-Galski H.: Eur. J. Immunol., **27**, 486-494 (1997); Hamawy, M. M. (szerkesztő): IgE Receptor (FceRI) Function: Mast Cells and Basophils, Springer Verlag, 1997]. IgE-receptorokat tartalmazó sejtek kizárólag hízósejtek és bazofil sejtek. Azonnali típusú allergiás reakciók tekintetében e sejtek felelősek a hatás közvetítéséért. E sejtek olyan hólyagocskákat tárolnak, amelyek erekre ható aminokat, továbbá prosztalgandint és leukotrint (arachidonsavszármazékokat) tartalmaznak. Ezen anyagok - hízósejtek degranulációjához vezető - leadása specifikus és nonspecifikus mechanizmus útján következik be. Ha sejtek - például a bőrön esett karcolás útján - mechanikusan roncsolódnak, hisztamin nonspecifikus leadása következik be. A sebben a bőr kivörösödik. Ödémák képződnek, továbbá a bőr viszket (háromszoros reakció). A hisztamint specifikusan leadó anyagok viszonylag csekély koncentrációban hatásosak, és a következő eseményláncolatot (jelkaszkádot) indítják el: C foszfolipáz aktiválása - a diacilglicerin és



IP3 második hírvivő képzése - a sejtbeli tárolókból kalcium mobilizálása - a granulák fúziója a sejtmembránnal - a granulák sejten kívüli ürülése citolízis nélkül - a heparinnal és egy bázikus proteinnel alkotott komplexből a pozitív töltésű hisztamin kicserélődése nátriumra - a hisztamin leadása a granulák mátrixából. Ha allergiában szenvedő beteg hízósejtjei és egy allergiát kiváltó anyag érintkeznek, akkor a sejt felületén lévő IgE-molekulák megkötik ezt az allergiát kiváltó anyagot. Ha az allergiát kiváltó anyag kellő számú molekulája megkötődik, a plazmamembránban lévő receptorok aggregációjára kerül sor. Az aggregáció a specifikus inger a sejt belsejében a fentiekben ismertetett jelkaszád kiváltására. A leadott anyagok kiváltják az allergiás tüneteket (kötőhártyagyulladás, nátha, asztma, gégeödéma, csalánkiütés, a kifejezett allergiás sokk kiváltásáig bekövetkező vérnyomáscsökkenés). Méhek mérgében lévő peptidek, így a hízósejtek degranulációját kiváltó peptid (MCD) szintén hízósejt-degranulációt váltanak ki. Nemkívánatos hatásként néhány gyógyszer is specifikus hisztaminleadást okoz. Humán betegek esetén izomgörcsoldó szerek, dextrán, acetil-szalicilsav (aszpirin), morfin, antibiotikumok, röntgenvizsgálati kontrasztszerek és idegen szérumok esetén ismertették a hisztamin leadását.

Amennyiben sikerül meggátolni a hólyagocskák összeolvadását a plazmamembránnal, akkor elmarad az aminok és arachidonsavszármazékok kiürítése. Ennek következtében allergiás reakciók kiváltására nem kerül sor. A kiválasztási folyamatban, illetve a leadásban számos protein (fúziós protein) vesz részt, amelyek kiválasztási hólyagocskák membránjain



és/vagy a plazmamembránokon lehetnek kötve. E proteinek előfordulhatnak a sejtfolyadékban is. SNAP 25, szinaptobrevin (VAMP) és szintaxin, illetve izomer alakjaik tartoznak e proteinekhez. Ezek a proteinek komplexet (fúziós komplexet) alkotnak, amely a kiválasztási hólyagocskákat a plazmamembrán belső oldalán rögzíti. A rögzítést megelőzi a hólyagocska összeolvadása a plazmamembránnal, amit Ca^{++} -ionoknak IgE közvetítésével sejtekbe való áramlása vált ki. A proteinek egyikének inaktiválása, vagyis a proteolitikus hasítás meggátlása által megakadályozható a komplex képződése.

Idegsejtek esetén a nevezett fúziós proteinek ismeretesen a *Bacillus Clostridium botulinum* által termelt idegmérgek könnyű láncának célmolekulái (szubsztrátumai) [Ahnert-Hilger G., Bigalke H.: Progress in Neurobiology, **46**, 83-96 (1995); Bigalke, H.: Clostridial Toxins, Handbook of Experimental Pharmacology and Toxicology, Just & Aktories (szerkesztők), Springer Verlag 1999]. Jelenleg a *Botulinum*-idegmérgek 7 különböző típusa ismert (A, B, C1, D, E, F és G). Az említett szinaptobrevin ezenkívül célmolekula a *Clostridium tetani* által termelt TeNT számára [Link E., Edelman L., Chou J., Binz T., Yamasaki S., Eisel U., Baumert M., Südhof T. C., Niemann H. és Jahn R.: Biochem. Biophys. Res. Comm. **189**, 18423-26 (1992)], valamint *Neisseria gonorrhoeae* eredetű proteáz számára [Binscheck T., Bartels F., Bergel H., Bigalke H., Yamasaki S., Hayashi T., Niemann H., Polner J.: J. Biol. Chem. **270**, 1770-1774, (1995)]. A legutóbb említett kivételével a toxinok legalább két funkcionális doménből állnak. A protein C-terminális része (nehéz lánc) felelős az idegsejthez való kötő-



déséért, míg az N-terminális rész (könnyű lánc) a fentiekben ismertetett, nagymértékben specifikus proteolitikus aktivitásban játszik szerepet. A toxinok a protein nehéz láncán keresztül kötődnek az idegsejtekhez, és receptor által közvetített sejten kívüli kiürítés és azt követő transzlokáció útján jutnak a sejtfolyadékba, ahol a fúziós komplexet felépítő egy vagy több megnevezett fúziós proteint hasítanak. A mindenkori protein hasítása után az acetilkolin, illetve egyéb átvivő kiválasztása az idegsejtekből gátlást szenved [Binscheck T. és Wellhöner H. H.: Tetanus and botulinum toxins - zinc proteases - synaptotagmin - exocytosis, Toxins and signal transduction, Gutman Y., Lazarovici P. (szerkesztők) 1, 457-487 (1997)].

Az átvivők ürítésének gátlását gyógyászatilag már hasznosítják rendellenes izomtónus okozta mozgászavarok kezelésére, valamint túlzott paraszimpatikus aktivitások csökkentésére [Benecke R., Kessler K. R.: Akt. Neurol. 22, 209-213 (1995)]. A *Clostridium* eredetű idegmérgek számára a fúziós proteineken kívül egyéb biológiai szubsztrátumok nem ismeretesek. A nehéz láncok affinitása perifériás idegsejtekhez nagy, úgyhogy az ezekkel összekapcsolt könnyű láncok csak ezekbe a sejtekbe jutnak be, és ezekben fejtik ki hatásukat, jóllehet egyéb sejtípusok, így hízósejtek és bazofil sejtek is - amelyekben kiválasztási folyamatok lejátszódnak - tartalmazzák a fent említett szubsztrátumokat, azonban nem áll rendelkezésre mechanizmus a proteázok felvételére [Marxen P., Fuhrmann U., Bigalke H. Toxicon 27, 849-859 (1989)].

A fentiek alapján a találmány hibrid protein, amely



- i) egy önmagában ismert proteinből, amely önmagában ismert módon hízósejtekhez és/vagy bazofil sejtekhez kötődik és/vagy amelyet hízósejtek és/vagy bazofil sejtek felvesznek, és
- ii) egy önmagában ismert proteázból, amely a hízósejtek és/vagy bazofil sejtek kiválasztószervének egy vagy több proteinjét hasítja,

áll vagy azokat tartalmazza.

A találmány egyik előnyös kiviteli alakja hibrid protein, amely

- i) egy proteinből, amely hízósejtekhez és/vagy bazofil sejtekhez kötődik és/vagy amelyeket hízósejtek és/vagy bazofil sejtek felvesznek, ahol a protein a következő csoportból van kiválasztva:
 - IgE,
 - IgE-fragmentum, különösen IgE-Fc-fragmentum,
 - hízósejtek és/vagy bazofil sejtek IgE-receptorainak antitestjei,
 - hízósejtek és/vagy bazofil sejtek IgE-receptorai antitestjeinek fragmentumai, különösen Fab-fragmentumok,
 - hízósejtsre pecifikus káliumcsatorna-antitest és
 - inaktív, azonban kötődő MCD-peptid, és
- ii) egy proteázból, különösen egy önmagában ismert proteázból, amely a hízósejtek és/vagy bazofil sejtek kiválasztószervének egy vagy több proteinjét hasítja,

áll vagy azokat tartalmazza.

A találmány egy további előnyös kiviteli alakja hibrid protein, amely



- i) egy proteinből, különösen egy önmagában ismert proteinből, amely hízósejtekhez és/vagy bazofil sejtekhez kötődik és/vagy amelyeket hízósejtek és/vagy bazofil sejtek felvesznek, különösen önmagában ismert módon felvesznek, és
- ii) egy proteázból, amely a hízósejtek és/vagy bazofil sejtek kiválasztószervének egy vagy több proteinjét hasítja, ahol a proteáz a következő csoportból van kiválasztva:
 - egy *Clostridium botulinum*-toxin, különösen A, B, C1, D, E, F vagy G típus könnyű lánc;
 - egy *Clostridium botulinum*-toxin, különösen A, B, C1, D, E, F vagy G típus könnyű láncának katalitikusan aktív fragmentuma;
 - tetanusztoxin könnyű lánc;
 - tetanusztoxin könnyű láncának katalitikusan aktív fragmentuma;
 - *Naisseria gonorrhoeae* IgA-proteáza és
 - *Naisseria gonorrhoeae* IgA-proteázának katalitikus doménje, áll vagy azokat tartalmazza.

A találmány szerinti hibrid proteinek további előnyös változatai i) proteinként az előzőekben felsorolt csoportból kiválasztott proteint és ii) proteázként az előzőekben felsorolt csoportból kiválasztott proteázt tartalmazzák.

A fenti hibrid protein egy *Clostridium botulinum*-toxin vagy tetanusztoxin könnyű láncán kívül az illető toxin nehéz láncának N-terminális részét (H_N -fragmentumát) vagy annak egy fragmentumát is tartalmazza.



A találmány ezenkívül a fenti hibrid protein alkalmazása hízósejtek degranulációjának gátlására.

Ha a hízósejteket előlnénk, allergiás sokk veszélye állna fenn, ha az elhaló hízósejtek a tárolt endogén aminokat leadnák. Ezenkívül a hízósejtek számának csökkenése e sejtek újbóli szintézisét stimulálja, és az új sejtek is rendelkezésre állnának allergiás reakciókhoz. A találmány szerinti hibrid protein ezáltal alapvetően különbözik az ismert IgE-Fc/pszeudomonasz-exotoxin-konjugátumtól, amely a protein szintézisét ADP-ribozilező aktivitása útján gátolja, és ezáltal sejthalált idéz elő [Fishman, A., Lorberboum-Galski H.: Eur. J. Immunol., **27**, 486-494 (1997)]. Ezzel szemben a találmány szerinti hibrid protein nem öli el a hízósejteket. A sejtek a behatást követően életképesek maradnak, és csak azt a képességüket veszítik el, hogy érszűkítő hatású aminokat adjanak le. Új hízósejtek szintézisének stimulálása elmarad. Terápiás alkalmazás esetén lehetséges toxikus mellékhatásokat elkerülünk, amelyek olyan konjugátum esetén lennének várhatóak, amely a komplett pszeudomonasz-toxin sejtmérge vagy összehasonlítható sejtmérge alapszik.

A találmány tehát olyan konjugátumra (hibrid proteinre) is vonatkozik, amely

- i) hízósejtekhez/bazofil sejtekhez nagy affinitású proteinből vagy peptidből (transzportproteinből/transzportpeptidből) és
- ii) a sejtek degranulációját vagy kiválasztási mechanizmusát gátló specifikus proteázból



áll. A konjugátum azonnali típusú allergiás reakciók kezelésére és megelőzésére szolgál.

i) A konjugátum nagy affinitású, hízósejtekhez kötődő komponenseként különösen E típusú immunglobulint (IgE), illetve ebből származtatott fragmentumot, így Fc-fragmentumot alkalmazunk. Ezenkívül hízósejtek/bazofil sejtek specifikus felületi molekulái tekintetében olyan antitesteket is alkalmazunk, amelyek szelektív módon kötődnek azok plazmamembránjához. Főleg az IgE-receptor antitestjei teljesítik ezt a célt. Fentiekén kívül a hibrid proteinben transzportpeptidként a hízósejteket degranuláló peptid inaktív, azonban kötődő mutánsait is alkalmazzuk. Ezek a transzportpeptidek/transzportproteinek arra szolgálnak, hogy proteázt juttassanak a sejtekbe. Ez a proteáz nagymértékben specifikus, a sejtek degranulációs mechanizmusát beindító proteineket hasít a hízósejtek fúzióskomplexében.

ii) Nagymértékben specifikus proteázként metalloproteínáz, így A, B, C1, D, E, F vagy G típusú botulinumtoxin (BoNT/X) vagy tetanusztoxin (TeNT) könnyű lánc vagy pedig *Neisseria gonorrhoeae* eredetű IgA-proteáz szolgál. Ezek a proteázok hasítják a szinaptoszomális kötődésű proteint (MR 25 000; SNAP 25), szinaptobrevint vagy szintaxint. Ha a megnevezett proteinek/peptidek csak egyike is el van hasítva, a hízósejtek degranulációja gátolt. Ekkor hisztamin, prosztaglandinok és leukotriének kiválasztása már nem megy végbe, és allergiás tünetek nem léphetnek fel.

A találmány értelmében a toxinok nem mérgező, könnyű láncai összekapcsolhatók transzportproteinekkal, amelyek ki-



zárólag hízósejtekhez, illetve bazofil sejtekhez kötődnek, és ezért csak ezek a sejtek veszik fel, ennek során a könnyű láncok - úgyszólván katapultálva - egyidejűleg ilyen sejtekbe jutnak. Idegsejtekbe vagy a szervezet egyéb sejttypusaiba nem tudnak behatolni, így hatásuk hízósejtekre és bazofil sejtekre korlátozott marad. Ha a szubsztrátumok egyike proteolitikus roncsolást szenved, ezen IgE-tartalmú sejtek allergiát kiváltó anyaggal vagy valamely fentiekben említett gyógyszerrel való érintkezését követően allergiás tünetek nem lépnek fel.

Hízósejtekre specifikus kapcsolóproteinként alkalmazhatók:

1. E típusú immunoglobulin, ennek Fc típusú fragmentuma,
2. IgE-receptor antitestek,
3. hízósejtet degranuláló peptidek és
4. hízósejtre specifikus káliumcsatorna antitest.

A felsorolt proteinek tekintetében a szakirodalomra utalunk a következők szerint:

- IgE és IgE-Fc-fragmentum [Helman L.: Eur. J. Immunol. **23** (1), 159-167 (1995)];
- hízósejtek/bazofil sejtek IgE-receptor antitestek, hízósejtre specifikus káliumcsatorna antitestek, valamint az antitestek Fab-fragmentuma [Liddel és Weeks: Antikörper-Techniken, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1995];
- MCD peptid [Gmacehl M. és Kreil G.: J. Biol. Chem. **270** (21), 12704-12708 (1995)];
- inaktív, azonban kötődő mutánsok, a mutált peptid előállítható ismert eljárással [Nichol D. S. T.: Gentechnische Methoden, Spektrum Akademischer Verlag, 1995];



- a különböző A-G típusú botulinumtoxinok könnyű láncai [Binz T., Kurazono H., M., Frevert J., Wernars K., Niemann H.: J. Biol. Chem. **265**, 9153-9158 (1990)];
- tetanusztoxin könnyű lánc [Link E., Edelmann L., Chou J., Binz T., Yamasaki S., Eisel U., Baumert M., Südhof T. C., Niemann H. és Jahn R.: Biochem. Biophys. Res. Comm. **189**, 18423-26 (1992)] és
- IgA-proteáz [Binscheck T., Bartels F., Bergel H., Bigalke H., Yamasaki S., Hayashi T., Niemann H., Polner J.: J. Biol. Chem. **270**, 1770-1774, (1995)].

Ismertettek IgE Fc továbbítására szolgáló rendszert (US 4 902 495).

Sejtaktivitást szabályozó hatóanyagról is beszámoltak (WO 94/21300).

A két komponens (transzportprotein és proteáz) összekapcsolása lefolytatható különböző módon. Először a toxin könnyű láncát kromatográfiai eljárással tisztítjuk. A könnyű lánc egyáltalán nem mérgező, minthogy a nehéz lánctól, a neurotrop transzportproteintől történő elválasztást követően nem juthat be idegsejtekbe, és sejten kívüli szubsztrátum nem fordul elő. A könnyű láncot ezután a hízósejtekhez kapcsolódó négy protein egyikével kémiai úton konjugátummá kapcsoljuk össze, amelyet hízósejtek sejtfolyadéka felvesz. Ott a könnyű lánc hasítja szubsztrátumát, miután hisztamin és egyéb anyagok kiválasztása gátolttá válik. A konjugátum egy második szintézisútja abban áll, hogy a könnyű láncot kódoló gént a hízósejtekhez kapcsolódó négy protein egyikét kódoló génnel fuzionáltatjuk, majd alkalmas gazdasejtekben hibrid proteint termelünk. Ez a



biotechnológiai úton előállított hibrid protein két proteinkomponensből előállított konjugátumhoz hasonlóan gátolja a hízósejtekből történő kiválasztási folyamatot.

Hibrid proteinek előállítása önmagában ismert eljárás, különösen a daganatos betegségek gyógyítása terén [Vogel, C.-W. (szerkesztő): Immunoconjugates: Antibody conjugates in radio-imaging and therapy of cancer, Oxford UP Inc., 1987; Magerstadt M.: Antibody conjugates and malignant diseases, CRC Press, 1991]. Ebben a gyógyászati megoldásban rákos sejtek elölésére a rákos sejtek felületi proteinjeire nézve antitestet kapcsolnak össze sejtméregnek minősülő proteinnel, amely többek között lehet ricin vagy difteriotoxin. A találmány szerinti eljárásban új a specifikus proteázok vagy proteolitikus domének alkalmazása hibrid proteinekben hízósejtek degradációjának gátlására és ezáltal allergia gyógyítására. Ezekkel a hibrid proteinnel nem csak a közérzetet erősen rontó allergiás tünetek (szénanátha, asztma és neurodermitisz) gátolhatók meg. E vegyületek beadhatók profilaktikusan is életmentő gyógyászati készítményekkel végzett terápia keretében allergiás reakciók elkerülésére. E hibrid proteinek ezenkívül meggátolhatnak allergiás tüneteket is, amelyek érzéketlenítés során lépnek fel.

A találmányt a következőkben példákkal szemléltetjük.

1. példa - Hibrid protein szintézise IgE bázisán és BoNT/A könnyű láncának előállítása

5,0 mg A típusú tisztított botulinumtoxint 15 mmol/l nátrium-tetraborátot és 30 mmol/l foszfátot tartalmazó, 8,4 pH-jú pufferben az egyensúly beállása után ugyanezen pufferrel e-



gyensúlyi állapotba hozott (1,0 x 3,0 cm méretű) QAE-Sephadex típusú oszlopra viszünk fel. Ezt követően az oszlopot 120 mmol/l ditioeritrolt, 2 mol/l karbamidot és 1 mmol/l EDTA-t tartalmazó 10 ml oldattal mossuk és éjszakán át inkubáljuk. Ezt követően a könnyű láncot az oszlopról 10 mmol/l koncentrációjú borátpufferrel eluáljuk, majd 7,0 pH-jú, 20 mmol/l foszfátot tartalmazó oldattal szemben dializáljuk.

Kereskedelmi forgalomban szerzünk be (patkány eredetű) E immunoglobulint. 10 mg immunoglobulint (4 °C hőmérsékleten éjszakán át) 1 ml foszfátpufferben 50 µg papainnal hasítunk. Az Fc-fragmentumot Sephacryl S200 típusú géliszűrő oszlopon tisztítjuk. 3,0 mg tisztított Fc-fragmentumot botulinum-toxin 3,0 mg tisztított könnyű láncával 2 ml 7,0 pH-jú nátrium-foszfát-oldatban lévő ditiobiszszukcinimidilpropionát bifunkciós szerrel 16 órán át inkubálunk. Az így szintetizált hibrid proteint (Sephacryl S200 típusú oszlopon lefolytatott) géliszűrés útján tisztítjuk, és SDS-gélelektroforézis útján tisztaságra elemezzük.

A hízósejtek degranulációjának gátlását két kísérletben vizsgáljuk. Az első kísérletben patkány eredetű hízósejteket a hibrid molekulával inkubálunk, és ezt követően stimuláljuk a hisztamin leadását. A stimuláláshoz specifikus hisztaminfelszabadító anyagokat, így MCD-peptidet és Concanavalin A nevű terméket használunk (utóbbi kísérletekben használatos anyag), illetve stimulálás céljából a sejtekben közvetlenül megnöveljük a kalciumkoncentrációt. Az utóbbi módszer esetén egyes hízósejtekbe kalciumot injektálunk. Ezáltal a fentiekben ismertetett jelkaskádót rövidre zárjuk, minthogy a kalciumkoncentráció



növekedése a kiválasztási folyamatban az a lépés, amelyet a hólyagocskák fúziója követ. A hízósejtek - hisztaminleadást tükröző - degranulációját fáziskontraszt-mikroszkóppal követjük. A továbbiakban leadott hisztamint mennyiségileg meghatározhatunk fluoreszcenciamérés segítségével. Végül elektrofiziológiai módszerrel meghatározhatjuk a hízósejtek növekedését, amelyet a degranuláció során hólyagmembránok plazmamembránba történő beágyazódása okoz. A hibrid proteinnel kezelt sejtekben - ellenőrző sejtekkel ellentétben -

1. morfológiai változások nem lépnek fel,
2. a sejtek felülúszójában a fluoreszcencia erősödése nem tapasztalható, és
3. a sejtek mérete nem növekszik.

Ezáltal igazolható, hogy a hibrid protein hisztamin leadását blokkolja.

A második kísérletben a hibrid proteint élő patkányokba injektáljuk. Néhány nap múlva a patkányokat leöljük, és a hízósejteket szokásos módon kinyerjük. A degranulációt, illetve hisztamin leadását a fentiekben ismertetett módon határozzuk meg. Ebben a kísérletben azt vizsgáljuk, hogy a konjugátum élő állatban is eljut a testnek abba a tartományába, ahol a hízósejtek vannak, és hogy a konjugátum a hízósejteket ott inaktiválja-e.

2. példa - Rekombináns hibrid protein előállítása *Clostridium botulinum* A típusú könnyű láncát kódoló gént az E immunglobulint vagy annak egyik fragmentumát (Fc-fragmentumát) kódoló génnel összekapcsolva



A botulinumtoxin A könnyű láncát kódoló gént alkalmas primer segítségével PCR (polimeráz lánc reakciója) útján izoláljuk. Ehhez A típusú *Clostridium botulinum* tenyészetét használjuk, amelyből a DNS-t preparáljuk. A toxingén publikált szekvenciája [Binz T., Kurazono H. M., Frevert J., Wenars K. és Niemann, H.: J. Biol. Chem. **265**, 9153-9158 (1990)] alapján primerpárt vezetünk le, és PCR útján amplifikáljuk a könnyű alegységet kódoló gént. Ezt követően e gént kereskedelmi forgalomban kapható pQE expressziós vektorban az előállító adatainak megfelelően klónozzuk.

A humán E immunoglobulin Fc-fragmentumát kódoló gént [Helman L.: Eur. J. Immunol. **23** (1), 159-167 (1995)] PCR útján kereskedelmi forgalomban kapható cDNS-bankból izoláljuk, és botulinumtoxin A könnyű láncát kódoló génnel vektorban fuzionáljuk.

A kapott vektorral alkalmas (*E. Coli*) M15-sejteket transzformálunk. Minthogy ebben az expressziós rendszerben az inszertált gének „hisz-toldattal” vannak ellátva, a rekombináns proteint Ni-affinitási oszlopon tisztítjuk. A nagy tisztaságú anyagot Shepacryl S300 típusú oszlopon lefolytatott gélszűrővel tisztítjuk.

A biológiai aktivitást ez esetben is izolált hízósejtek *in vitro* vizsgálatával határozzuk meg.

3. példa - Rekombináns hibrid protein előállítása tetanusztoxin könnyű alegységét kódoló gént a hízósejtet degranuláló peptidet (MCD) kódoló mutált génnel összekapcsolva



A hízósejteket degranuláló peptid - 22-tagú - szekvenciája ismert [Gmachl M. és Kreil G.: J. Biol. Chem. **270** (21), 12704-12708 (1995)]. Ennek alapján megfelelő oligonukleotidot szintetizálunk.

Tetanusztoxin könnyű alegysége szekvenciájának izolálására *C. tetani* tenyészetet használunk, és abból kinyerjük a DNS-t. A tetanusztoxin ismert nukleinsavszekvenciájából PCR számára primert és ezáltal a toxin könnyű alegységét kódoló gént nyerünk ki.

Az 1. példában ismertettek szerint mindkét nukleinsavszekvenciát pQU expressziós vektorban fuzionáljuk, majd *E. coli* gazdasejtben exprimáljuk. A hibrid proteint - amely ez esetben is hisz-toldattal van ellátva - affinitási oszlopon lefolytatott kromatográfiás eljárással és azt követően gélszűrés útján tisztítjuk. A hízósejteket degranuláló peptidet kódoló tisztított gént kémiaiilag szintetizáljuk a peptid aktív doménjében lefolytatott pontmutációval. E gént összekapcsoljuk a tetanusztoxin könnyű láncát kódoló génnel. A hibrid proteint *E. coli* gazdaszervezetben exprimáljuk és tisztítjuk. Az így előállított hibrid proteint hízósejtek degranulációs vizsgálatában *in vitro* tanulmányozzuk.

4. példa - Rekombináns hibrid protein előállítása az IgE Fc-fragmentumát kódoló gén és az IgA-proteázt kódoló gén összekapcsolásával

Az IgE Fc-fragmentumát kódoló gént az 1. példában ismertetett módon izoláljuk.

Az *N. gonorrhoeae* eredetű IgA-proteázt kódoló gén ismert. Ebből primert vezetünk le, és *N. gonorrhoeae* nukleinsavprepa-



rátumából PCR útján kinyerjük a specifikus proteázt kódoló gént.

A két nukleinsavat kereskedelmi forgalomban kapható vektorban a gyártó adatainak megfelelően egyesítjük, és a hibrid proteint affinitási oszlopon lefolytatott kromatográfiás eljárással tisztítjuk (lásd a 2. példát).

A gátló aktivitást ez esetben is (a fentiekben ismertetett módon) izolált hízósejteken *in vitro* mutatjuk ki.

5. példa - IgE-receptor antitestjének Fab-fragmentumából és B típusú botulinumtoxin könnyű láncából álló hibrid protein előállítása

Hízósejteken lévő IgE-receptor monoklonális antitestjét kereskedelmi forgalomban szerezzük be, és kromatográfiás eljárással utótisztítást végzünk. 0,5 mg antitestet F botulinumtoxin 0,4 g tisztított könnyű láncával konjugálunk. Az idegtoxin előállítása után a könnyű alegységet az 1. példában ismertetett módon az idegtoxin hasításával és ezt követően ioncserés kromatográfiás eljárással végzett tisztítással izoláljuk.

A két proteint (F típusú toxin könnyű alegységét és monoklonális antitestet) bifunkciós reagenssel kapcsoljuk össze egymással. Ehhez az izolált proteineket 10 mmol/l koncentrációjú malemidobenzoil-N-hidroxi-szukcinimid-észterrel inkubáljuk. Ezt követően a hibrid proteint Shepacryl S300 típusú oszlopon lefolytatott gélszűréssel tisztítjuk meg nemkonjugált proteinektől.

Ez esetben is izolált hízósejteken igazoljuk, hogy a szintetizált hibrid protein gátolja a hisztamin kiválasztását.



Szabadalmi igénypontok

1. Hibrid protein, amely

- i) egy önmagában ismert proteinből, amely önmagában ismert módon hízósejtekhez és/vagy bazofil sejtekhez kötődik és/vagy amelyet hízósejtek és/vagy bazofil sejtek felvesznek, és
- ii) egy önmagában ismert proteázból, amely a hízósejtek és/vagy bazofil sejtek kiválasztószervének egy vagy több proteinjét hasítja,

áll vagy azokat tartalmazza.

2. Hibrid protein, amely

- i) egy proteinből, amely hízósejtekhez és/vagy bazofil sejtekhez kötődik és/vagy amelyeket hízósejtek és/vagy bazofil sejtek felvesznek, ahol a protein a következő csoportból van kiválasztva:
 - IgE,
 - IgE-fragmentum, különösen IgE-Fc-fragmentum, hízósejtek és/vagy bazofil sejtek IgE-receptorainak antitestjei,
 - hízósejtek és/vagy bazofil sejtek IgE-receptorai antitestjeinek fragmentumai, különösen Fab-fragmentumok,
 - hízósejtre specifikus káliumcsatorna-antitest és
 - inaktív, azonban kötődő MCD-peptid, és
- ii) egy proteázból, különösen egy önmagában ismert proteázból, amely a hízósejtek és/vagy bazofil sejtek kiválasztószervének egy vagy több proteinjét hasítja,

áll vagy azokat tartalmazza.



3. Hibrid protein, amely

- i) egy proteinből, különösen egy önmagában ismert proteinből, amely hízósejtekhez és/vagy bazofil sejtekhez kötődik és/vagy amelyeket hízósejtek és/vagy bazofil sejtek felvesznek, különösen önmagában ismert módon felvesznek, és
- ii) egy proteázból, amely a hízósejtek és/vagy bazofil sejtek kiválasztószervének egy vagy több proteinjét hasítja, ahol a proteáz a következő csoportból van kiválasztva:
 - egy *Clostridium botulinum*-toxin, különösen A, B, C1, D, E, F vagy G típus könnyű lánc;
 - egy *Clostridium botulinum*-toxin, különösen A, B, C1, D, E, F vagy G típus könnyű láncának katalitikusan aktív fragmentuma;
 - tetanusztoxin könnyű lánc;
 - tetanusztoxin könnyű láncának katalitikusan aktív fragmentuma;
 - *Naisseria gonorrhoeae* IgA-proteáza és
 - *Naisseria gonorrhoeae* IgA-proteázának katalitikus doménje,áll vagy azokat tartalmazza.

4. A 2. vagy 3. igénypont szerinti hibrid protein, amely a 2. igénypont szerinti csoportból kiválasztott i) proteint és a 3. igénypont szerinti csoportból kiválasztott ii) proteázt tartalmaz.

5. A 4. igénypont szerinti hibrid protein, amely egy *Clostridium botulinum*-toxin vagy tetanusztoxin könnyű láncán kívül az illető toxin nehéz láncának N-terminális részét (H_N -fragmentumát) vagy annak egy fragmentumát is tartalmazza.



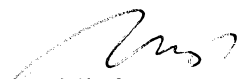
6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti hibrid protein alkalmazása hízósejtek degranulációjának gátlására.

BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR
BIOTECHNOLOGISCHE ENT-
WICKLUNG UND CONSULTING MBH

helyett a meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.


dr. Vitális László

szabadalmi ügívivő

19 oldal leírás
0 oldal rajz

19 oldal

