

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

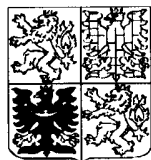
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2009-96

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12. 01. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **13.01.94**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/181492**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 12. 97**
(Věstník č. 12/97)

(86) PCT číslo: **PCT/US95/00408**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 95/19435**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/12
C 12 N	15/70
G 01 N	33/68
C 07 K	14/725
A 61 K	38/17

(71) Přihlašovatel:

T CELL SCIENCES, INC., Needham, MA, US;

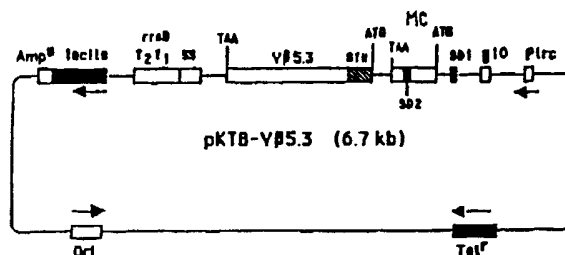
(72) Původce:

Makrides Savvas C., Bedford, MA, US;

Kung Patrick C., Lexington, MA, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
11000;



(54) Název přihlášky vynálezu:

**Proteiny V regionu antigenního receptoru
T buněk a metody jejich přípravy**

(57) Anotace:

Předložený vynález se týká produkce kompletních proteinů V regionů antigenního receptoru T buněk. Vynález poskytuje způsob exprese proteinů jakož i expresní vektory pro zvýšenou produkci kompletních proteinů V regionů antigenního receptoru. Vynález dále poskytuje Vβ5.3 region protein. Proteiny podle vynálezu mají použití v diagnostice a terapii s imunitou spojených chorob.

CZ 2009-96 A3

2009-96

85263
DOŠLO
21. XI. 96
URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

Proteiny V regionu antigenního receptoru T buněk a metody jejich přípravy

Oblast techniky

Předkládaný vynález se obecně týká oblasti imunologie a medicíny a týká se plně rekombinantních proteinů V oblasti receptoru T buněk (TCR), expresních vektorů pro produkci komerčně využitelného množství rekombinantních proteinů V regionu antigenního receptoru T buněk a metod užití plně rekombinantních proteinů V regionu antigenního receptoru T buněk k diagnóze a léčbě chorob nebo poruch imunitního systému.

Dosavadní stav techniky

1. ANTIGENNÍ RECEPTOR T BUNĚK

Imunitní odpověď na cizorodé antigeny je rozdělena do protilátkové odpovědi, zprostředkované B buňkami a buněčné imunity, zprostředkované T buňkami. Receptorové molekuly užívané B buňkami k rozpoznání antigenu jsou imunoglobuliny, které rozpoznávají konformační epitopy na globulárních proteinech. Antigení receptory na T buňkách mají vztah k imunoglobulinům, ale váží zpracovanou antigenní molekulu v asociaci s molekulami hlavního histokompatibilního systému (MHC) (Dembic et al., 1986, Immunol. Today, 7:308).

TCR geny, stejně jako imunoglobulinové geny, sestávají z kodujících regionů (nebo genových segmentů), které se přeskupují během vývoje T buňky (Chien et al., 1984, Nature, 312:31-35, Hedrick et al., 1984, Nature, 308:149-153, Yanagi et al., 1984, Nature, 308:145-149). Lokus lidského

β řetězce receptoru T buněk byl rozsáhle studován od klonování první cDNA kodující β řetězec (Yanagi, Y. et al. 1984, Nature, 308:145-149, Hedrick et al. 1984, Nature, 308:149-152, Siu et al., 1984, Cell, 37:393-401). Tento lokus je komplex genů obsahující oblasti kodující známé regiony nebo domény β řetězce: variabilní (V), diversity (D), a joining (J) domeny. Tyto kodující regiony se v somatických buňkách účastní na přestavbě spolu s oblastmi kodujícími konstantní (C) domenu (Chien et al., 1984, Nature, 309:322-326). In situ studie identifikovaly umístění TCR β lokusu na chromosomu 7 v 7q35 (Isobe et al., 1985, Science, 228:580). Podle novějších hodnocení se tento komplex rozkládá na více než 600kb a obsahuje 70-80 segmentů regionu (Concannon et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6598-6602, Tillinghass et al., 1986, Science, 223:879-883, Kimura et al., 1987, Eur. J. Immunol., 17:375-383, Lai et al., 1988, Nature, 331:543-546). Tyto genové segmenty V regionu sousedí se dvěma tandemově organizovanými regiony, z nichž každý zahrnuje D a C genový segment následovaný nakupením šesti nebo sedmi genovými segmenty J regionu (Tunnacliffe et al., 1985, Nucleic Acid Res., 13: 6651-6661, Toyonaga et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 8624-8628). Po úspěšné přestavbě V, D a J kodujících regionů (genových segmentů) se translatovaný polypeptid β řetězce páruje s TCR α řetězcem a může být exprimován na povrchu T buněk (zmněno Kronenbergem et al., 1986, Ann. Rev. Immunol., 4:529-591).

TCR α a δ lokus jsou vedle na chromosomu 14. TCR δ kodující regiony jsou úplně uvnitř α genového lokusu (Satyanarayana et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8166-8170, Chien et al., 1987, Nature, 330: 722-727, Elliot et al., 1988, Nature, 1985, 331:627-631). Odhaduje se, že je

minimálně 45 - 50 Va kodujících regionů (Becker et al., 1985, Nature, 317:430-434), zatímco je pouze přibližně 10 Vδ kodujících regionů (Chien et al., 1987, supra). V periferní krvi se jeví být dva Vδ kodující regiony predominantně exprivovány, jmenovitě Vδ 1 a Vδ 2.

Gama TCR gen byl prvně identifikován u myši (Saito et al., Nature, 309: 757-762, Kranz et al., 1985, Nature, 313, 762-755, Hayday et al., 1985, Cell, 40:259-269) a poté u lidí (Lefranc et al., 1985, Nature, 316: 464-466, Murre et al., 1985, Nature, 316:549-552). Lidský gama TCR lokus se patrně sestává z 5 až deseti V, pěti J a dvou C kodujících regionů (Dialynas et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:2619).

TCR diversita a tak specifita T buněk, je odvozena z několika pramenů (Barth et al., 1985, Nature, 316: 517-523, Fink et al., 1986, Nature, 321:219-225): multiplicity genových segmentů germinativních linií (Chien et al., 1984, Nature, 309:322-326, Malissen et al., 1984, Cell, 37: 1101-1110, Gascoigne et al., 1984, Nature, 310:387-391, Kavalier et al., 1984, Nature, 310:421-423, Siu et al., 1984, Nature, 311:344-349, Pattern et al., 1984, Nature, 312:40-46), kombinatoriální diversitou způsobenou nahromaděním různých V, D a J kodujících regionů (Siu et al., 1984, Cell 37:393-401, Goverman et al., 1985, Cell, 40:859-867), a junkční flexibilitou, diversitou N regionu a užitím buď hromadných D regionů nebo kteréhokoliv ze tří translačních čtecích rámečků pro Dβ segmenty. TCR diversita patrně nepramení z mechanismu somatické hypermutace pozorované pro imunoglobuliny (Barth et al., supra.) Výsledkem tohoto mechanismu je, že TCR jsou generovány s odlišnostmi v jejich amino-terminálních nebo N-terminálních doménách (t.j. jsou konstruovány z kombinací V, D

a J kodujících regionů), ale jinde se shodují, zahrnujíc v to jejich karboxy - terminální nebo C-terminální domény (které tvoří konstantní regiony TCR). V souladu s tím je generován extrémně široký repertoar TCR molekul.

Studie struktury a diversity variabilních kodujících regionů lidských TCR β řetězců vedly k rozdělení těchto kodujících regionů do odlišných podrodin V regionu (Tillinghast et al. 1986, Science, 223: 879-883, Concannon et al. 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6598-6602, Boerst et al., 1987, J. Immunol., 139:1952-1959). Každá z podrodin V regionu může být charakterisována shodou sekvencí a obsahuje podobné kodující regiony vykazující tak větší než 75% podobnost v DNA sekvenci. Například, šestnáct myších V β sekvencí bylo kategorizováno do čtrnácti odlišných podrodin ustanovenou, ale jednoduchou numerickou nomenklaturou pro V β genové segmenty (viz Barth et al., 1985, "The Murine T Cell receptor Employs a limited repertoire of expressed V β gene segments", Nature, 316:517-523). V souladu s touto nomenklaturou členové podrodiny sdílí první číslici a liší se v druhé, proto V β 8.1, V β 8.2 a V β 8.3 jsou členy V β 8 podrodiny. Podobný systém byl navržen pro lidské kodující regiony. U lidí bylo přibližně 60 V β kodujících regionů rozděleno do alespoň 24 rodin. (Toyonaga a Mak, 1988, Ann. Rev. Immunol. 5:585, Wilson et al., 1988, Immunol. Rev., 101:149, a Robinson, M.A., 1991, J. Immunol., 146:4392).

2. T BUNKY V AUTOIMUNITĚ

T buňky hrají osovou roli v diferenciaci a regulaci efektorových mechanismů v imunitním systému (Paul et al., 1987, Science, 195: 1293-1300). Společné rozpoznávání antigenu a molekul hlavního histokompatibilního systému musí být

specifické a precísne regulované, pretože nevhodná imunitní odpověď vede k autoimunitě. Několik laboratoří studovalo choroby, ve kterých se jeví být nevhodná imunitní odpověď, jako je autoimunita a některé formy imunodeficiencí, a určovalo roli T buněk v patogenezi takovýchto chorob.

Některé nežádoucí imunitní odpovědi jsou charakterisovány klonální nebo oligoklonální expanzí zvláštní TCR kompozice jako například při malignitách, které vedou k T - buněčným leukemiím nebo lymfomům. (viz, např. Jack et al., 1990, Am.J.Pathol., 136:17, Nitta et al., 1990, Science, 249:672, a Yoshino et al. 1991, Int.J.Cancer, 47:654). V T buněčných leukemiích a lymfomech hraje TCR roli jako unikátní nádorový marker, protože je stabilně představován a presentován na povrchu buněk. Zvláštní TCR kompozice je také naznačena u orgánových štěpů, jejichž T lymfocyty mají TCR reaktivní s MHC antigeny jednotlivých dárců, například dárců kostní dřeně.

Několik skupin popsalo selektivní expresi TCR V regionu v jistých autoimunitních situacích. Například Grunvald et al. zmínil přednostní expresi V α 2.3 genového produktu na CD 4+ buňkách z bronchoalveolární laváže ve srovnání s lymfocyty z periferní krve u pacientů se sarkoidosou (Grunvald et al, 1992, Eur.J.Immunol., 22: 129). U Kawasakiho choroby byla zmíněna přednostní expanse V β 2 a V β 8 T buněk v počátku nemoci (Abe J., et al., 1992, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89:4066)

Revmatoidní artritida (RA) byla široce studována z těchto hledisek. Někteří výzkumníci zmínili přednostnou expanzi jistých podskupin T buněk, t.j. DerSimonian et al., 1993, J.Exp.Med., 177:1623 (preferenční expanse T buněk nesoucích V alfa 12.1 v CD8+ T lymfocytech periferní

krve), Stamenkovic et al., 1988, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 85:1179 (T buňky infiltrující synoviální membránu kultivované IL2 byly oligoklonální při Southern blot analýze), Paliard et al., 1991, Science, 253:325 (hypotese, že superantigenem aktivované V β 14 T buňky, včetně autoreaktivních T buněk, expandují klonálně a migrují do synoviální tekutiny RA pacientů), Howell et al., 1991, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 88:10921 (zmiňuje užití jednotlivých genů V β 3, 14, a 17 v regionu T buněk v IL 2R+ buňkách ze synoviální tekutiny RA pacientů), Uematsu et al., 1991, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:8534 (užití oligoklonální geny V oblasti T buněk v T buňkách synoviální tekutiny jednotlivých RA individuí), Mezinárodní Patentová Publikace WO 90/06758 (implikace V β 3, 9 a 10 u RA).

Zánětlivé střevní choroby byly také široce studovány. Několik skupin zmínilo expansi populace T buněk nebo preferenční užití genu V regionu TCR t.j. Posnett et al. 1990, J.Clin.Invest, 85:1770, Spencer et al., 1991, J.Clin.Pathol., 44:915, Treidosiewitz et al., 1991, Clin.Exp.Immunol. 84: 440, Van Kerckhove et al., 1992, J.Exp.Med., 175: 57. Jiní popsali preferenční využití TCR V genu u *Mycobacterium leprae* (van Shooten et al., 1992 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:11244, Wang et al., 1993, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90:188.

Roztroušená sklerosa (MS) je autoimunitní onemocnění charakterisované infiltrací centrálního nervového systému mononukleáry a demyelinizací. Ačkoliv je patogeneze MS neznámá, při vzniku choroby se uplatňují jak vlivy genetické tak vlivy prostředí. Hlavní složky genetické predispozice zahrnují asociaci choroby s jednotlivými haplotypy třídy II hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) (Terasaid et al., 1976, Science, 193:1245-1247, Ho et al., 1982,

Immunogenetics, 15:509-517, Spielman et al., 1982, Epidemial. Rev., 4: 45-65, Francis et al., 1986, Lancet, 1:211, Elian et al., 1987, Disease Markers, 5:89-99, Urban et al., 1988, Cell, 54: 577-592, Vandebark et al., 1989, Nature, 341:541-544, Howell et al., 1989, Science, 246:668-670).

Bylo ukázáno, že T buňky izolované z cerebrospinálního moku pacientů trpících MS využívají omezenou sadu genů V regionu TCR. Demonstrace in vivo aktivovaných T buněk specifických k myeli basickému proteinu (MBP) implikovala MBP reaktivní T buňky v patogenezi onemocnění (Wucherpfenig, K.W. et al., 1990, Science, 248: 1016-1019). Studie s využitím amplifikace cDNA polymerasovou řetězovou reakcí (PCR) s TCR V β primery ukázala, že MBP reaktivní T buněčné linie využívají pouze omezené množství V β kodujících regionů (Wucherpfennig, K.W., et al., 1990, supra (V β 17 a v menším rozsahu V β 12 jsou často využívány k rozpoznání imunodominantního regionu lidského autoantigenu MBP), Oksenberg J.R., et al., Nature, 362:68-70 (přestavba V β 5.2 a/nebo V β 5.3 genů byla detekována v mozcích pacientů s jistým HLA fenotypem), Kotzin, B.L., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9161-9165 (přednostní užití ~~A~~ řetězců variabilního regionu 5.2/5.3 a menším rozsahu V~~A~~ 6.1 pozorované mezi MBP specifickými klony od pacientů s MS). Výsledky některých studií také naznačují, že je omezená exprese genů TCR V α v MS mozkových lézích (Oksenberg J.R. et al., 1990, Nature, 345:344-346).

3. PŘÍSTUPY K TERAPII ZPROSTŘEDKOVANÉ T BUNĀKAMI

V minulosti byly snahy selektivně ovlivnit T buněčnou populaci jednotlivce zaměřeny na vakcinaci celými živými nebo

atenuovanými T lymfocyty (pro přehled tohoto přístupu viz Cohen, I.R., 1986, Immunol.Rev., 94:5-21), nebo s peptidovou vakcinou založenou na selekci specifické části peptidu TCR V regionu. Tyto přístupy byly založeny na novém zjištění, že potenciálně patogenní T buňky preferenčně užívají limitovanou sadu V kodujících regionů. Přístup vyvinutý Cohenem užívá živé nebo atenuované T buňky jako vakcinu k léčbě nebo prevenci, *inter alia*, experimentální autoimunitní encephalomyelitidy (EAE). Nicméně, tento přístup je omezen závislostí na izolaci klonů pro onemocnění specifických T buněk: je nezbytné léčit každého pacienta jeho vlastními expandovanými buňkami, jak vyžaduje "šitá na míru" nebo individuální terapie. (viz. Zhang, et al., 1993, Science, 261:1451).

Jiní předpokládali terapeutické užití TCR peptidů založených na využití TCR V regionu (Offner H., 1991, Science, 251:430 (léčba peptidy založenými na TCR V β 8 aminokyselinových sekvencích redukovala vážnost choroby a akcelerovala zotavení u krys Lewis), Hashim, G.A., et al., 1992, J.Immunol., 149:2803-2809, Offner H. et al., 1992, J.Immunol., 148: 1706-1711, Offner H. et al., 1991, J.Immunol., 146:4165-417, ale viz. Sun, D., 1992, Cell.Immunol., 141:200-210). Tyto peptidy jsou všeobecně krátké peptidy, obvykle mezi 8-25 aminokyselinami délky, a výjmečně délky větší než 30 aminokyselin. Například 21 aminokyselinový peptid přítomný na TCR řetězci asociovaný s EAE byl užit k prevenci EAE u krys Lewis (Vandenbark A.A. et al., 1989, Nature, 341:541-544, Vandenbark A.A., International Patent Publication WO 91/01133, viz také Janeway, C.A. 1989, Nature, 341: 482-483). Jiní popsali, že ještě kratší peptidy o 8-11 aminokyselinách, korespondující s částí β řetězce VDJ regionu nebo J alfa regionu se ukazují být efektivní jako vakciny pro buď prevenci nebo redukci

vážnosti EAE na krysím modelu (Howel, M.D., et al, 1989, Science, 246:668-671, Howel, M.D. et al., Mezinárodní patentová publikace WO 92/12996).

Peptidy odvozené od TCR proteinů byly obecně vybrány jako kandidáti pro autoimunitní terapeutika vzhledem ke snadné peptidové syntese a vzhledem k tomu, že žádná z metod nebyla dříve vhodná pro produkci delších proteinů TCR V regionu v dostatečném množství a se signifikantní biologickou aktivitou. Ještě důležitější je to, že hlavní nedostatek malých syntetických peptidů je ten, že jejich užití vyžaduje předpovězení jednotlivé sekvence, která bude efektivní v modulování imunitní odpovědi. Určení musí být provedeno jako antigenní a imunogenní vlastnosti navrženého peptidu, jako například výskyt v hypervariabilním nebo komplementaritu určujícím regionu (CDR) V regionu. Navíc, velikost navrhovaných peptidů odvozených z jednotlivých TCR musí počítat s udržení správné epitopové struktury k navození aktivity T supresorových buněk nebo k navození uvolnění protilátek namířených proti subpopulaci T buněk nesoucí jednotlivý TCR (se kterým peptid koresponduje). Peptidy takových vlastností vyžadují značný čas a výzkum, a mnoha případech zamýšlené terapie u lidí nemohou být nezbytné experimenty provedeny z humaních nebo etických důvodů.

Navíc, aby se získala specifická antigenní odpověď prostřednictvím regulačních T buněk musí být peptid navázán na MHC molekuly jednotlivce. MHC antigeny přítomné na povrchu buněk mají polymorfní regiony ve kterých jsou specifické alely asociovány s jednotlivými individui. Navíc, jednotlivci budou mít dva haplotypy, což znamená, že zde budou dvě odlišné alely jednotlivého MHC antigenu pro stejný lokus. Ne všechny peptidy mají kapacitu pro vazbu na MHC antigeny, a ani všechny MHC

antigeny se neváží na jednotlivé peptidy, protože existuje množství MHC antigenů pro každý haplotyp. Proto vhodnost takového peptidového přístupu k T buňkami zprostředkované terapii musí být determinována k haplotypu každého jednotlivce, vyžadující tak vytvoření peptidů pro jednotlivé pacienty.

4. PRODUKCE SOLUBILNÍCH ANTIGENNÍCH RECEPTORŮ T BUNĚK

Produkce většího množství solubilních TCR proteinů rekombinantní technikou byly problematické z několika důvodů. Hlavní překážkou při produkci solubilního antigenního receptoru T buněk je sekrece v nepřítomnosti transmembránového regionu (Traunecker A. et al., 1986, Immunol. Today, 10:29-32). Jeden výzkumník byl schopen ukázat sekreci celé délky monomerního β řetězce myšího TCR včetně V, D a J regionu následovanou zkrácenou formou C β regionu. Metodika využívala výhody homologie mezi karboxylovým koncem lehkého řetězce imunoglobulinu a sekvencí okolo Cys 241 v TCR β řetězci. Výsledný konstrukt využíval chimerického genu kodujícího sekvenci k-řetězce úvodního peptidu od MPC 11 a rearanžovaný VDJ exon. Výsledný konstrukt byl exprimován v savčích buňkách a byl detekován v buněčném supernatantu. Metoda nebyla přesvědčivá, nicméně, znamenala získání plné délky proteinu V regionu za nepřítomnosti cizích proteinových sekvencí, protože sekrece byla závislá na přítomnosti zkráceného C β exonu (Gasgoigne, N., 1990, J. Biol. Chem., 265 (16):9296-9301).

Jiná skupina se pokoušela dosáhnout exprese solubilní formy TCR β řetězců v biochemicky signifikantním množství expresí rekombinantního TCR heterodimeru ukotveného fosfatidyl inositol glykanovou vazbou. Metoda produkovala malé (0,5mg)

množství celého TCR řetězce, který vyžadoval štěpení od povrchu transfektovaných buněk fosfatidyl inositol specifickou fosfolipasou C (Lin,A.Y.,1990,Science,249:677- 679).

Jiní produkovali chimerické molekuly mícháním variabilních a konstantních domén myšího TCR s konstantní oblastí lehkého řetězce κ imunoglobulinu. Výzkumníci byli schopni dosáhnout malého množství secernované solubilní formy heterodimerického α TCR (Gregoire C. et al.,1991, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:8077-8081). Gregoire et al. předvedli myší chimeru sestávající se z C α a V α genů K85-C2 spojených s C regionem kapa lehkých řetězců monoklonální protilátky S105. Také předvedli V β C β C kapa chimeru. Obě byly transfektovány do savčích B - myelomových buněk , které neexprimovaly lehké ani těžké řetězce nativních imunoglobulinů (viz též Weber,S., et al.,1992, Nature,356:793-795).

Novotny et al.,1991, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88: 8646-8650, demonstrovali metodu pro produkci solubilního TCR s antigen-kombinujícími vlastnostmi. Syntetický oligo linker byl klonován do C konce V β a N konce V α regionu vytvářejícím jednořetězcový V β V α . Vzniklý expresní vektor koduje pelB leader následovaný okamžitě v rámečku V β ,linkerem,a V alfa segmenty. Exprese konstruktů je pod kontrolou lacZ promotoru a je proto IPTG-indukovatelná.

Nedávno jedna skupina ukázala sekreci malého množství V regionu T buněčného receptoru fúzaného k karboxy - terminálnímu polyhistidinovému "ocas". Plasmidy obsahují pelB leader a jsou pod kontrolou chemicky indukovaného promotoru (Ward, E.S.,1991, Scan.J.Immunol.,34:215-220). Práce nicméně selhává v popisu jak získat proteiny V regionu antigeního receptoru T buněk při absenci fusního partnera nebo

jak získat komerčně využitelné množství receptoru V regionu.

Proto je zde velká potřeba agens a farmaceutických komposic, které mají vlastnosti specificity pro cílenou autoimunitní odpověď, předvídatelnosti v jejich selekci a výhodnosti a reprodukovatelnosti přípravy.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká výše zmíněných problémů tím, že poskytuje poprvé úspěšnou produkci universálního agens pro léčbu uvedenými T buňkami zprostředkovaných chorob, ve kterých jsou implikovány podskupiny T buněk. Přesněji, vynález poskytuje využitelné množství kompletních proteinů V regionu TCR, které mohou být přirozeně zpracovány, poskytujícíce tak mnohotně aktivní fragmenty pro in vivo zpracování, a presentované antigen presentujícími buňkami každého jedince, za eliminace potřeby "na míru šitých" terapeutických agens. Také je poskytována třída rekombinantních expresních vektorů pro produkci proteinů V regionu TCR v bakteriích. Rekombinantní proteiny V regionu TCR tohoto vynálezu jsou využitelné v léčbě, prevenci nebo supresi imunitních chorob. V jiném využití mohou být TCR molekuly kombinovány ve směsi s farmaceuticky přijatelným nosičem pro užití jako terapeutická komposice. V jiném využití mohou být nárokové proteiny V regionu TCR užity diagnosticky k charakterisaci jednotlivých imunitních chorob. Proteiny TCR V regionu předkládaného vynálezu mohou být užity jako diagnostické sondy vzhledem k jejich schopnosti vázat se s autoprotiilátkami. Výhodou předkládaného vynálezu je to, že proteiny V regionu antigenního receptoru T buněk jsou exprivovány v nepřítomnosti fúsních proteinů nebo afinitních

koncovek. Další výhodou předkládaného vynálezu je to, že proteiny V regionu TCR jsou produkovány v komerčně přijatelném množství, které je použitelné k přípravě kompozic, které jsou terapeuticky efektivní v léčbě autoimunitních chorob zproředkovaných T buňkami.

Vynález dále poskytuje expresní vektor pro produkci čisté kompletní molekuly V regionu TCR. Expresní vektor vynálezu zahrnuje jako základní jednotku kodující region pro V region antigenního receptoru T buněk. TCR kodující region vynálezu molekula nukleové kyseliny kodující kompletní protein V regionu TCR. Ve výhodném provedení zahrnuje TCR kodující region strukturální kodující sekvence pro V β 5.3 region.

Expresní vektory zde popsané poskytují prostředky pro indukovatelnou expresi proteinů V regionu TCR. V preferovaném provedení je kodující sekvence pro V region antigenního receptoru T buněk pod transkripční kontrolou indukovatelného bakteriálního promotoru. V souladu s tímto vynálezem je indukovatelný bakteriální promotor subjektem buď chemické, nebo termální regulace. Nejlépe je indukovatelný bakteriální promotor subjektem termální indukce.

V jednom uplatnění zahrnuje expresní vektor předkládaného vynálezu regulační geny kodující proteiny schopné vazby na promotor a tak schopné potlačovat transkripci s indukovatelného promotoru. V preferovaném provedení je promotor odvozen z E.coli lac operonu a regulační geny obsahují funkční mutaci E.coli lacI represorového genu. Tento mutantní lacI gen (lacI_{ts}) koduje teplotně sensitivní represorický protein a užití těchto lacI_{ts} genů dovoluje termální indukci promotoru. V preferovaném provedení je indukovatelným bakteriálním promotorem trc promotor a termální

indukce je poskytnuta lacIs regulačním genem.

V jednom provedení je regulační gen umístěn na kotransformovaném vektoru. V jiném provedení je regulační gen umístěn na chromosomech hostitelských bakteriálních buněk. V preferovaném provedení je regulační gen umístěn na rekombinantním expresním vektoru. V dalším preferovaném provedení transkripční směr mutantního lacI genu je stejné orientace jako strukturální gen antigeního receptoru T buněk, který má být exprivován.

Rekombinantní expresní vektory předkládaného vynálezu mohou výhodně obsahovat kodující sekvence pro leader nebo signální peptid. Taková leader sekvence, fusovaná v rámečku a 5' do kodujícího regionu TCR V regionu, který má být exprivován, řídí syntesu proteinu V regionu TCR majícího N-terminální leader peptid, který postupně řídí sekreci rekombinantního proteinu přes membranu hostitelské buňky. Jiné provedení předkládaného vynálezu nevyužívá leader sekvence a žádoucí produkt V regionu je izolován z buněk, t.j. extrakcí moče.

V preferovaném provedení obsahuje rekombinantní expresní vektor předkládaného vynálezu v 5' -3' směru:trc promotor, vazebné místo pro ribosom, volitelnou leader sekvenci, kodující region pro kompletní V region antigeního receptoru T buněk, stop kodon, jeden nebo více transkripčních terminátorů, lacIs regulační gen tak, že směr transkripce je stejný jako pro kodující region V regionu antigeního receptoru T buněk, bakteriální zdroj replikace a gen resistance pro tetracyklin.

Tento vynález také poskytuje metody pro produkci proteinů

V regionu TCR v signifikantně větším množství než dříve popsané.

Předkládaný vynález poskytuje kompozice a metody pro léčbu pacientů majících imunitní poruchy. Taková léčba zahrnuje podání kompozic v souladu s tímto vynálezem subjektů, které potřebují takovou léčbu, v množství a dobu vhodnou pro regulaci řečených poruch imunity. Výhodou presentovaného vynálezu je to, že kompozice vynálezu dovolují léčbu imunitních poruch bez potřeby selekce jednotlivých peptidových fragmentů a bez upravování jednotlivých kompozic pro jednotlivé léčené jedince.

Vynález se také týká užití proteinů kompletního V regionu antigeního receptoru T buněk v terapii autoimunitních chorob a poruch. Ve specifickém provedení se vynález týká užití kompletního V β 5.3 proteinu ve terapii. V jiném provedení poskytují vynález kompletní proteiny V regionu antigeního receptoru T buněk ve výrobě léku pro léčbu autoimunitních chorob a poruch. Tak je v jednom provedení vynález schopný užití kompletní proteiny V regionu ve výrobě léčiva pro léčbu imunitních chorob jako je MS.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr.1. Kompletní nukleotidová sekvence [SEQ ID NO.25 a SEQ ID NO.26] a aminokyselinová sekvence [SEQ ID NO.27] kompletního V β 5.3 proteinu vynálezu.

Obr.2. Plasmidová mapa pKTB-V β 5.3. Tento plasmid obsahuje P_{trc}, trc promotor, g10, g10 leader genový segment z bakteriofágu T7, SD1, vazebné místo pro ribosomy 1, MC, minicistron kodující vazebné místo pro ribosom 2 (SD2) AAG GAG (viz SEQ ID NO.28 pro

kompletní nukleotidovou sekvenci minicistronu) a peptid Met Tyr Arg Leu Asn Lys Glu Glu (SEQ ID NO.29), STII ,STII leader sekvence, V β 5.3,V β 5.3 kodující region, T1T2,transkripční terminatory rrnB operonu, lacIts gen kodující teplotně sensitivní lac represor, Ori, zdroj replikace a Tet⁵,gen resistance na tetracyklin.

Předkládaný vynález popisuje rekombinantní expresní vektory a metody pro dostatečnou produkci většího množství proteinů V regionu antigenního receptoru T buněk a jejich využití, zahrnujíc v to diagnosu, léčbu, prevenci nebo supresi imunitních chorob nebo poruch.

Pro produkci vysokých hladin kompletních proteinů V regionu TCR byla vyvinuta serie vektorů.Navíc je poskytnuta metoda pro produkci komerčně využitelného množství kompletních rekombinantních proteinů V regionu TCR užitím expresních vektorů předkládaného vynálezu. Metody a expresní vektory předkládaného vynálezu jsou unikátní díky tomu, že poskytují produkci kompletní V region antigenního receptoru T buněk v nepřítomnosti jiných proteinových sekvencí nebo fusních partnerů. Jak je detailně popsáno v podstatě vynálezu,supra,V region antigenního receptoru T buněk byl, v minulosti produkován pouze jako část většího proteinu a ve velmi nízké úrovni. Tyto cizí proteiny mohou způsobovat nežádoucí imunogenicitu, jsou -li užity in vivo, a jsou často označeny povolovacími úřady jako nedovolené znečištění. Dříve čištěné proteiny V regionu zahrnují jiné regiony TCR, jako je C region,fusovaný s V regionem. Jiné konstruované expresní systémy poskytovaly TCR V region jako chimerický protein, t.j.V region fusovaný na část imunoglobulinové molekuly.

Expresní vektory a metody tohoto vynálezu poskytují dále

zvýšené hladiny exprese proteinů V regionu antigenního receptoru T buněk. Primární úmyslem při produkci proteinu , který má komerční využití, například ve výzkumu, diagnostice a terapii, je vyrobení komerčně využitelného množství proteinu. Předkládaný vynález proto poskytuje zvýšenou produkci proteinů V regionu TCR. Předkládaný vynález umožňuje produkci proteinů V regionu ve větším množství, t.j. od 1 do 500 mg /l bakteriální kultury, nebo více. Výhodně je úroveň produkce proteinů alespoň 100 mg/litr. V nejpreferovanějším provedení předkládaný vynález poskytuje produkci alespoň 300 mg Vβ proteinu na litr bakteriální buněčné kultury.

Metody a expresní vektory předkládaného vynálezu umožňují produkci proteinů V regionu TCR za absence cizích proteinových sekvencí. Vynález tak eliminuje několik kroků spojených se získáváním purifikovaných proteinů V regionu TCR, pokud je připravovaný podle předešlého. V jednom provedení umožňuje vynález exprese zvýšeného množství proteinů V regionu termální indukci, která vylučuje nezbytnost eliminování chemických inducerů, jako je IPTG. Protože proteiny V regionu TCR jsou produkovány v souladu s vynálezem bez přítomnosti cizích proteinů, umožňuje vynález zjednodušenou produkci relativně čistých produktů. Vynález eliminuje další zpracovatelské kroky, jako je zavedení enzymů nebo chemických reagens do systému vyloučení proteinů jako jsou jakékoliv fusované non-TCR peptidové segmenty nebo afinitní konečky. Takové manipulace nejsou pouze vhodné pouze k redukci množství nabytého V region produktu, také vkládají elementy , které musí být eliminovány, t.j. dalšími purifikačními kroky.

1. V REGION ANTIGENÍHO RECEPTORU T BUNĚK

Protein V regionu antigeního receptoru T buněk

předkládaného vynálezu je kompletní V region antigenního receptoru T buněk. Kompletní protein V regionu TCR je kodovaný kodujícím regionem pro V region antigenního receptoru T buněk. Kodující region TCRV regionu je nukleotidová sekvence kodující kompletní protein V regionu antigenního receptoru T buněk. V rozsahu tohoto vynálezu zahrnuje V region variabilní region antigenního receptoru T buněk. V rozšířeném pohledu mohou být poznatky tohoto vynálezu aplikovány k získání zvýšené exprese TCR proteinů včetně V regionu a navíc, celý nebo část D a/nebo J regionu. Proteiny V regionu TCR jsou produkovány za nepřítomnosti cizích proteinových sekvencí, jako je například, jiný TCR region, tak jako konstantní region, transmembránový region nebo cytoplasmatický region. Navíc, protein V regionu TCR vynálezu je produkován v nepřítomnosti non-TCR fusních partnerů, jako jsou afinitní konečky. Navíc, protein V regionu TCR není produkován jako součást většího chimerického proteinu obsahujícího část jiné proteinové molekuly jako je imunoglobulinový protein.

Rozpoznání toho, že DNA sekvence kodující jeden z komplementaritu určujících regionů (CDR) V regionu receptorů T buněk může aktualně překlenout známé spojení mezi V a D kodujícími regiony (tak jako v případě CDR 3 V β 5.3) jak je zde použito, "celá délka" kodujícího regionu V regionu může zahrnovat celou kodující sekvenci takového CDR, který překlenuje V-D spojení, část takového CDR, který je pouze umístěn ve známém V regionu nebo žádnou ze sekvencí kodujících takový CDR. Navíc, kompletní protein V regionu antigenního receptoru T buněk předkládaného vynálezu může být jakýkoliv V region antigenního receptoru T buněk a není omezen pouze na V β regiony (t.j., V regiony TCR β řetězce). Proto, proteiny V regionu antigenního receptoru T buněk mohou být variabilní regiony alfa podjednotky, beta podjednotky, delta podjednotky

nebo gama podjednotky.

V preferovaném provedení je protein V regionu TCR jakýkoliv V region antigeního receptoru T buňky, pro který je vhodná kompletní kodující sekvence. Metody pro získání kompletní kodující sekvence předkládaného vynálezu jsou v oboru dobře známé. DNA sekvence domén lidského V regionu mohou být izolovány podle dobře známých postupů z celé řady lidských buněk. Výhodně jsou těmito buňkami T lymfocyty periferní krve.

DNA sekvence předkládaného vynálezu mohou být připraveny různými cestami. Je preferováno, aby DNA sekvence V regionů antigeních receptorů T buněk byly připravovány polymerasovou řetězovou reakcí (PCR) užitím DNA sekvencí kodujících intaktní TCR jako templátů. Lidský V β region může být připraven například cestou amplifikace cDNA připravené z lidských lymfocytů periferní krve stimulovaných anti-CD3 protilátkou, podle postupu Choie et al., 1989, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:8941-8945.

V jednom aspektu předkládaného vynálezu je získán kompletní V region antigeního receptoru T buněk z jakéhokoliv klonu obsahujícího kompletní sekvenci. Například, některé sekvence V regionu TCR a cDNA klony obsahující kompletní kodující regiony jsou popsány Concannonem et al., 1986, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:6598-6602.

Preferované proteiny V regionu TCR předkládaného vynálezu jsou ty, které jsou implikované u imunitních chorob a poruch, konkrétně V α 8.1 (Kawasakiho choroba, viz., Abe et al., 1992, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4066), V α 6.1 (lepra, viz. Wang et al., 1993 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 188, V β 5.1 (lymská nemoc, viz., Lahesma et al.

1993, J. Immunol., 150:4125), V β 5.2, nebo V β 5.3 nebo V β 6.1 (roztroušená sklerosa, viz. Kotzin et al., 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9161), V β 2.1 nebo V β 3.1 (revmatoidní artritida viz Uematsu et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8534). (Viz také Hafler ,D.A. et al., 1988, J. Exp. Med., 167:1313, a Mantgazza R. et al., 1990, Autoimmunity, 3: 431).

TCR exprivovaný klony T buněk u autoimunitních chorob nebo klony T buněk odpovídajících na jednotlivé autoantigeny mohou být identifikovány užitím TCR specifických protilátek, například polyklonálních, monoklonálních nebo chimerických protilátek, které jsou specifické pro TCR variabilní segment spolu s metodou značení protilátek, jako je fluorescenční mikroskopie, průtoková cytometrie, imunocytochemie nebo jiné techniky v oboru dobře známé. Takové protilátky jsou popsány pro množství alfa a/nebo beta řetězců V regionů TCR (viz , například mezinárodní patentová publikace WO 90/06758).

Alternativně může být DNA nebo m RNA klonů T buněk označena přímo, nebo po amplifikaci PCR (Synha et al., 1988, Science, 239:1026, Saiki et al., 1986 Nature, 324:163), a specificky hybridisována probami nukleových kyselin pro různé rodiny TCR genů užitím hybridizačních metod v oboru dobře známých. TCR sekvence nebo jejich části mohou být získány přímo z amplifikované, rearanžované DNA nebo mRNA.

Expresse jednotlivých TCR může být také identifikována určením sekvence nukleových kyselin kodujících alespoň část TCR, například po klonování TCR V genu, nebo určením aminokyselinové sekvence alespoň části TCR proteinu. Je zjevné, že jakýkoliv z výše zmíněných přístupů, nebo jiné

přístupy v oboru známé, povedou k identifikaci TCR exprivovaného na T buňkách nebo liniích T buňek.

Příklady molekulárních přístupů užitých ke korelaci TCR genové exprese při onemocněních zahrnují:

- (1) produkci a analýzu cDNA knihoven získaných s chorobou spojených T buněk od jednoho nebo více subjektů majících tuto chorobu, aby se určila přítomnost frekventně užívaných nebo dominantních TCR genů.
- (2) Southern analýzu vzorků choroby k určení specifického genového polymorfismu (t.j.RFLP) nebo existence oligoklonálních TCR přestaveb.
- (3) analýzu vzorků choroby cDNA syntesou, PCR amplifikací, a slot blot hybridizací, a
- (4) in situ hybridizací nukleových kyselin nukleových kyselin T buněk TCR probami bez předešlé kultivace těchto buněk.

Preferované proteiny V regionu TCR zahrnují V β 8.1, V β 5.2, nebo V β 5.3. Dvouvláknová cDNA kodující V β 5.3 a aminokyselinová sekvence pro V β 5.3 jsou ukázány na obrázku 1 (Viz SEQ ID NOS 25, 26 a 27).

Klony V regionu antigeního receptoru T buněk mohou být zavedeny do expresních vektorů předkládaného vynálezu metodami v oboru dobře známými. Například, z cDNA klonu je V region syntetizován PCR inkorporováním iniciačního ATG do 5' konce. Může být syntetizováno jakékoli vhodné restrikční místo, které inkorporuje iniciační kodon a rekonstituuje 5' kodující region V regionu. V preferovaném provedení je restrikčním místem NcoI místo. Stop kodon a vhodné restrikční místo jsou vloženy do 3' konce kodující sekvence pro V region tak, že může být subklonována do vektoru.

Mělo by být jasné, že metodologie tohoto vynálezu může být užita k přípravě kompletních V regionů TCR odvozených ze zvířecích druhů jiných než humáních.

2. EXPRESNÍ VEKTORY

Rekombinantním expresním vektorem v rozsahu tohoto vynálezu je plasmid, který obsahuje exogenní DNA ve formě nukleové kyseliny kodující V region TCR, který má být exprimován. Rekombinantní expresní vektor předkládaného vynálezu je vložen do buněk bakteriálního hostitele například transformací a transformanty, které exprimují požadovaný protein V regionu, jsou izolované a klonované.

Předkládaný vynález se týká expresních vektorů obsahujících DNA sekvenci kodující pro kompletní protein V regionu TCR. Výhodně, proteiny V regionu TCR jsou ty proteiny antigenických receptorů T buněk, které jsou zde popsány. Expresní vektor v rozsahu tohoto vynálezu je plasmid, obsahující geny V regionu TCR, které mají být exprimovány, pod transkripční a translační kontrolou regulačních elementů, jako je například promotor, vazebné místo pro ribosomy a transkripční terminátor. Navíc obsahuje zdroj replikace pro stabilní replikaci bakterie. Také výhodně obsahuje geny kodující resistenci na antibiotika usnadňující selekci transformovaných buněk nesoucích plasmid. Expresí klonovaných sekvencí se vyskytuje, je-li expresní vektor vložen do vhodné hostitelské buňky.

Expresní vektory užití v předkládaném vynálezu jsou často ve formě plasmidu. Plasmidy znamenají cirkulární dvouvláknové DNA sekvence, které nejsou integrovány do chromosomů. Expresní vektory předkládaného vynálezu mohou také obsahovat jiné DNA

sekvence, jako například leader nebo signální sekvence, které jsou užitečné pro zaměření nebo stabilitu expresních produktů a/nebo regulační sekvence, které umožňují modulaci genové exprese, například odpovědí na změnu teploty nebo změnu složení kultivačního media.

Expresní vektory obsahují jednu nebo více kontrolních sekvencí funkčně vázaných na sekvence kodující V region TCR. Termín "funkčně vázaný" v rozsahu tohoto vynálezu znamená, že jedna sekvence nukleových kyselin, která má regulační funkci pro genovou expresi nebo koduje funkční proteinovou domenu, je kovalentně vázaná na buď 3' nebo 5', ke druhé sekvenci nukleových kyselin kodujících protein tak, že regulační funkce použita na druhou sekvenci nukleových kyselin nebo kodovaných funkčních domen bude fusována do rámečku k proteinu kodovanému druhou nukleovou kyselinou. Takové regulační funkce pro genovou expresi obvykle zahrnují iniciaci transkripce, terminaci transkripce a zpracování mRNA transkriptu. Sekvence nukleových kyselin, které vykazují takové regulační funkce na genovou expresi, zahrnují promotory transkripce, transkripční terminátory a signály mRNA zpracování. Funkční domeny, které mohou být funkčně vázané k jiným proteinům zahrnují například leader nebo signální peptidy, které dovolují transport proteinů přes buněčnou membranu.

V jednom provedení může být promotorem indukovatelný promotor. V preferovaném provedení je promotor takový, že může být regulován přítomností nebo absencí jistých komponent media. V oboru zkušenosti poznají, že některé bakteriální promotorové subjekty ke kontrole přítomnosti nebo absence jistých komponent media, mohou být užity ve spojení s expresními vektory předkládaného vynálezu. Je preferováno aby

promotorem byl silný bakteriální promotor jako je lac promotor, tac promotor a trc promotor. Proto v jednom provedení je ve vektoru tohoto vynálezu promotorem pro kodující sekvenci V regionu TCR subjekt regulovaný přítomností nebo absencí isopropyl- β -D-thiagalaktopyranosid (IPTG), spontánní chemická induktorová molekula lac,tac a trc promotorů. V preferovaném aspektu je IPTG - indukovatelným promotorem lac promotor nebo tac promotor. V preferovanějším provedení je IPTG-indukovatelným promotorem trc promotor (Brosius et al.,1985,J.Biol.Chem.,260:3539-3541),který je podobný tac promotoru, derivovanému fúzí 10-regionu lac UV5 promotoru s -35 regionu tryptofanového operonu (de Boer et al.,1983, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:21-25, Amann et al.,1983, Gene,25:167-178). Trc promotor je shodný s tac promotorem s výjimkou jednoho páru bází v promotoru (Brosius et al.,(1985)supra).

V dalším provedení je expresní vektor předkládaného vynálezu modifikován tak,aby umožňoval sekreční expresi kompletního proteinu V regionu TCR vynálezu teplotním posunem.Podle tohoto provedení umožňuje expresní vektor expresi proteinu V regionu TCR za absence chemických induktorů,což vylučuje potřebu užití takových elementů jako je IPTG a řetězce bakteriálního hostitele obsahující lacI nebo lacI^qgeny. Preferované provedení expresních vektorů předkládaného vynálezu zahrnují regulační geny ,které umožňují termální expresi. Regulační genovou sekvencí je nejlépe lacI^s gen, který koduje teplotně sensitivní lac represor.

V dalším preferovaném provedení je lacI^s gen lokalizován proximálně od a po řetězci od transkripčního terminatoru, a trankripční směr je stejný jako u kodující sekvence V regionu.

Navíc, expresní plasmidy tohoto vynálezu výhodně obsahují jeden nebo více selektovatelných markerů. Výhodně vede selektovatelný genetický marker k resistenci na antibiotika jako je ampicilin, kanamycin nebo tetracyklin. Nejvýhodněji je selektovatelným markerem gen resistance na tetracyklin.

Dále, vektory obsahují bakteriální zdroj replikace. V preferovaném provedení je zdroj replikace odvozen od pBR322. Expresní vektor také obsahuje vazebné místo pro ribosomy a transkripční terminator *rrnB* ribosomálního RNA operonu *E. coli* (Brosius et al., *Plasmid*, 6: 112-118).

V preferovaném provedení expresní vektor předkládaného vynálezu obsahuje jako základní elementy v 5' -3' směru: DNA sekvenci, která obsahuje promotor a operator, DNA sekvenci, která obsahuje vazebné místo pro ribosomy pro předložení mRNA požadovaného genu schopného vazby na ribosomy v hostitelské buňce, ATG iniciační kodon nebo DNA sekvenci, která je konvertována do ATG iniciačního kodonu po inserci požadovaného genu do vektoru, restrikční místo pro inserci požadovaného genu v rámečku s ATG iniciačním kodonem nebo multiplikované klonující místo obsahující několik restrikčních míst pro inserci vhodného genu nebo kodujícího regionu ,který má být exprivován, sekvenci nukleových kyselin kodující sekvenci V regionu antigeního receptoru T buněk, která má být exprivovaná, a transkripční terminátor, který slouží k účinnému ukončení transkripce. Vektor také obsahuje DNA sekvence, které obsahují zdroj replikace z bakteriálního plasmidu schopného autonomní replikace v hostitelských buňkách a DNA sekvence, které obsahují geny asociované se selektovatelnými nebo identifikovatelnými fenotypickými rysy, které se manifestují, jestliže je vektor přítomen v hostiteli. Expresní vektor může

volitelně obsahovat signální nebo leader kodující sekvence funkčně vázané, t.j. fusované v rámečku, na 5' konec sekvence nukleových kyselin kodující V region TCR tak, že translace leader sekvence - TCR V region sekvence vede k leader peptid-V region TCR fusnímu proteinu, ve kterém leader peptid na amino konci fusního proteinu řídí sekreci proteinu V regionu TCR přes membránu hostitelské buňky. V jistém preferovaném provedení obsahuje expresní vektor regulační gen pro expresi sekretovaného proteinu teplotním posunem.

V preferovanějším provedení obsahuje expresní vektor následující základní elementy v 5' -3' směru: trc promotor, který je složen z -10 regionu lac UV 5 promotoru fusovanému s -35 regionem tryptofanového operonu (de Boer et al, supra, Amann et al. (1983) supra), silné ribozom vázající místo, kodující region V regionu TCR, který má být exprivován, dva transkripční terminatory z rrnB ribosomálního RNA operonu, lacIts gen kodující pro teplotně sensitivní lac represor, pBR322 zdroj replikace, a gen resistance pro tetracyklin. Příklad takového preferovaného provedení, expresní vektor pKBi-V β 5.3 byl uložen podle Budapeštské smlouvy v American Type Culture Collection (ATCC) pod přírůstkovým číslem 69739 6.ledna 1995.

Expresní vektory předkládaného vynálezu mohou obsahovat leader sekvence kodující signální peptidy funkčně vázané na 5' kodující region V regionu TCR. V expresi bude řídit amino terminální koncový peptid sekreci proteinu V regionu TCR přes membránu hostitelské buňky, do periplasmy kultivačního media. Odborník pozná, že množství leader sekvencí může být užito ve spojení s expresním vektorem předkládaného vynálezu. Vhodnou leader sekvencí je pelB signální sekvence z *E. carotovora* (Lei et al., 1987, *J. Bacteriology*, 169:4379-

4383). Jiná vhodná leader sekvence je termostabilní enterotoxin II (ST II) signální sekvence E.coli (Morioka-Fujimoto et al., 1991, Biol.Chem., 266:1728-1732).

V jednom provedení obsahuje expresní system STII leader sekvenci, a kodující region pro V region je PCR syntetizován tak, aby obsahoval vhodné restriční místo v 3' konci a zapracované MluI místo na 5' konci a tak může vhodně vázat MluI místo inkorporované do 3' konce STII leaderu. Proto v dalším preferovaném provedení obsahuje expresní vektor ve směru 5' - 3' :trc promotor, který se skládá z -10 regionu lac UV 5 promotoru fuso vanému s -35 regionem tryptofanového operonu, silné ribosom vázající místo, STII leader, kodující region V regionu antigeního receptoru T buněk, který má být exprivován, transkripční terminátor z rrnB operonu, lacIts gen kodující teplotně sensitivní lac represor, pBR322 zdroj replikace a gen resistance pro tetracyklin. V nejpreferovanějším užití je vektorem pKB-V β 5.3.

Expresní vektor předkládaného vynálezu může být konstruován užitím standartních technik známých v oboru (Viz. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982).

Předkládaný vynález se navíc zabývá hostitelskými buňkami obsahujícími expresní vektor, který obsahuje DNA sekvenci pro kompletní V region TCR. Navíc, preferované hostitelské buňky obsahují expresní vektor, zahrnující jednu nebo více kontrolních DNA sekvencí schopných přímé replikace a nebo exprese DNA sekvence kodující pro kompletní protein V regionu antigeního receptoru T buněk. Vhodné hostitelské buňky zahrnují prokaryotické hostitelské buňky, v preferovaném provedení jsou prokaryotickými hostitelskými buňkami bakteriální hostitelské

buňky, nejlépe E.coli buňky. Odborníci pochopí z okamžité aplikace, že užití jednotlivých expresních vektorů ovlivní výběr hostitelských kmenů vybraných pro produkci kodující pro kompletních proteinů v regionu TCR. Například, expresní vektory podrobené chemické indukci v rozsahu tohoto vynálezu, bakteriální hostitelské kmeny, které nesou lacI nebo lacI^q gen, který reguluje trc promotor, jsou zejména využívány. V expresních vektorech v rozsahu tohoto vynálezu jsou preferovány takové, které obsahují genové regulační sekvence jako lacI^{ts} gen, který poskytuje teplotně sensitivní represor, a takové bakteriální hostitelské kmeny, které nenesou divoký typ lacI nebo lacI^q geny. Zejména je preferována hostitelská buňka LJ24.

V jistém provedení neobsahuje expresní vektor předkládaného vynálezu leader sekvenci. V jistém preferovaném provedení je bakteriálním hostitelským kmenem E.coli BL21, nebo lépe proteasa deficientní E.coli kmeny, jako je SG21163, SG22094, SG21173.

Expresní vektory předkládaného vynálezu mohou být zavedeny do hostitelských buněk různými metodami známými v oboru, které se mohou měnit v závislosti na typu celulárního hostitele. Například, působení chloridu vápenatého nebo elektrokorporace jsou všeobecně používány pro prokaryotické buňky. (Viz obecně, Maniatis, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982).)

Když byl exprivovaný vektor jednou vložen do vhodné hostitelské buňky, hostitelská buňka může být kultivována za podmínek dovolujících expresi značného množství v regionu TCR.

Hostitelská buňka obsahující expresní vektor ,který obsahuje DNA sekvenci kodující pro proteiny V regionu TCR může být identifikována jakoukoliv vhodnou metodou.V následujících příkladech,například,je produkce proteinů V regionu TCR detekována imunologicky užitím imunozkoušky.

Alternativně, hostitelská buňka obsahující expresní vektor předkládaného vynálezu může být identifikována hodnocením hladiny transkripce DNA V regionu TCR měřením specifických transkriptů V regionu TCR v hostitelské buňce (t.j. northern blot analýsa). V ještě další metodě může být hostitelská buňka obsahující expresní vektory předkládaného vynálezu identifikována DNA-DNA hybridizací za použití prob komplementárních ke kodujícím sekvencím V regionu TCR vektoru.

DNA sekvence předkládaného vynálezu, expresní vektory nebo DNA molekuly mohou být určeny různými metodami známými v oboru. Například dideoxydovou řetězovou terminační metodou jak ji popisuje Sanger et al.,1977, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463-5467.

Následující příklady poskytují a užívají jednu nebo více detekčních metod popsaných výše,odborníci mohou ,bez přehnaného experimentování,snadno vybrat kombinace expresních vektorů a hostitelských buněk,které poskytují optimální expresi proteinů V regionu TCR.Kombinací jednotlivého hostitelského kmenu s jednotlivým expresním vektorem tohoto vynálezu je možné získat relativně vysokou úroveň exprese kompletního proteinu receptoru T buňky.Výhodně je úroveň exprese kompletního proteinu V regionu TCR alespoň 300 mg na litr kultury.Takové hladiny mohou být získány například užitím preferovaného provedení ve kterém je E.coli SG21173 bakteriálním hostitelským kmenem a pKBi-V β 5.3 expresním vektorem (viz příklady,infra).Takové kombinace hostitelů

a expresních vektorů tohoto vynálezu dovolují produkci signifikantní kvantitý kompletního proteinu V regionu TCR při menších nákladech, než bylo možné dříve.

Jakmile jsou exprivovány mohou být proteiny vynálezu purifikovány v souladu se standartními procedurami, včetně precipitace amonium sulfátem, afinitní chromatografií, kolonovou chromatografií, gelovou elektroforesou a pod. (viz, obecně, Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, NY (1982).)

V preferovaném provedení je V region antigeního receptoru T buňky solubilní. Tímto je míněno, že V region antigeního receptoru T buňky je solubilní ve vodném systému. "Solubilní" protein je všeobecně charakterisován selháním sedimentace při pokojové teplotě při vysoké G-síle centrifugace (100 000 x g) z vodného pufru. Solubilita je zejména důležitá pro zjednodušení purifikace V region antigeního receptoru T buňky z produkujících buněk. Vodné pufrы užitě v proteinové chemii typicky mají pufrovací sloučeninu pro udržení určitého pH. (typicky v mezích fyziologického rozmezí okolo pH 5-9), poskytují jednotlivé ionizované řetězce (typicky mezi asi 10 mM a 500 mM), a často zahrnují proteasový inhibitor a střední detergent. Příkladem standartních pufrů jsou fosfátový pufrovaný sůl, Tris - pufrovaná sůl, a množství pufrů užívaných k izolaci proteinů. (viz, obecně, Methods in Enzymology, Mahlers and Cordes Biological Chemistry (2d Ed.), Harper and Row, New York (1966).)

3. UZITÍ PROTEINŮ ANTIGENÍHO RECEPTORU T BUNĚKY

Předkládaný vynález poskytuje poprvé prostředky pro dostatečnou a ekonomickou produkci diagnosticky, terapeuticky

a vědecky užitečného množství proteinů V regionu TCR, který není fusním proteinem ani není navázán na cizí sekvence, jako jsou afinitní konečky.

A. Užití ve výzkumu a diagnostice

Proteiny V regionu TCR předkládaného vynálezu jsou využitelné ve strukturálních a funkčních studiích antigeního receptoru T buněk (TCR). Vedle nabídky substrátu nebo vazebné domeny pro specifické formy TCR mohou tyto proteiny sloužit jako prostředky pro konformační studie, t.j. pro přiblížení nativní konformace různých částí receptoru T buněk.

Proteiny V regionu T buněk mohou také být použity jako diagnostické proby. V jednom preferovaném provedení mohou být proteiny V regionu TCR předkládaného vynálezu užity pro určení množství nebo přítomnosti jistých podrodin V regionu TCR v biologickém vzorku. Jedna taková zkouška je popsána Ritterhousem, C.W. v, International Patent Publication WO 92/08981 pod názvem "Therapeutic and Diagnostic Methods Using Total Leukocyte Surface Antigens". Předkládaný vynález poskytuje metody pro diagnosu imunitních chorob jako je roztroušená sklerosa, detekcí specifických podskupin T buněk asociovaných s chorobou.

V jiném provedení může být předkládaný vynález použit ke generaci signifikantního množství proteinů V regionu antigeního receptoru T buněk pro užití v produkci protilátek. Protilátky mohou být připraveny použitím mnoha technik v oboru známých. Pro produkci monoklonálních protilátek (MAb) může být použita jakákoliv metoda, která poskytuje produkci protilátkové molekuly kontinuálními buněčnými liniemi v kultuře. Tato metoda zahrnuje, ale není tím omezena, hybridizační techniky originálně popsané Kohlerem

a Milsteinem, 1975, Nature, 256: 495-497), nověji hybridizační techniky lidských B buněk (Kozbor et al, 1983, Immunol. Today, 4:72, EBV techniky (Cole et al., Monoclonal Antibodies and cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985), a trauma techniky . Pro přehled metod produkce protilátek viz: Hartlaw, E., et al., Antibodies: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

Proteiny V regionu TCR vynálezu mohou být užity jako diagnostické proby vzhledem k jejich schopnosti reagovat s autoprotiilátkami v biologických vzorcích.

Předkládaný vynález také předkládá značené deriváty proteinů V regionu TCR , které mohou být detekovány vhodnými monitory, jako je scintilační Geigrova komůrka , nebo radiografický film. Takové deriváty zahrnují např. ^{125}I , ^{131}I , ^{14}C , ^{35}S , ^3H , ^{112}In , ^{99}M , Tc a podobně, pro in vitro a in vivo diagnostické účely.

B. TERAPEUTICKÉ VYUŽITÍ

Jak bylo zmíněno výše, tento vynález je spojen s imunitními chorobami.

Termín "imunitní choroby" zde označuje choroby , ve kterých je imunitní systém zapojen do patogeneze choroby , nebo ve kterých vhodná stimulace imunitního systému může vést s ochraně před chorobou. Relevantní choroby zahrnují, ale nejsou těmito omezeny , autoimunitní choroby, neoplastické choroby, infekční choroby , hypersensitivitu , transplantaci, reakci štěpu proti hostiteli, a degenerativní choroby nervového systému. Autoimunitní choroby zahrnují, ale

nejsou jimi omezeny , artritidu, jako je revmatoidní artritida, I typ diabetu, juvenilní diabetes, roztroušenou sklerozu , autoimunitní tyreoiditida (Hashimotovu tyreoiditidu), myasthenia gravis, systémový lupus erythematosus (SLE), Sjogrenův syndrom, Gravesovu chorobu, Addisonovu chorobu, Goodpasturov syndrom, sklerodermii, dermatomyozitidu, myxedem, polymyozitidu, perniciosní anemii, zánětlivé střevní choroby včetně Crohnovy nemoci a autoimunitní atrofické gastritidy, a autoimunitní hemolytickou anemii. Neoplastické choroby zahrnují , ale nejsou jimi omezeny, lymfoproliferativní choroby jako jsou leukemie, lymfomy, Non-Hodgkinovy lymfomy a Hodgkinovy lymfomy, a karcinomy jako je karcinom prsu, tlustého střeva, plic, jater, pankreasu, melanom, karcinom ledvin, atd. Infekční choroby zahrnují , ale nejsou jimi omezeny, virové infekce způsobené viry jako HIV, HSV, EBV, CMV, Influenza, Hepatitis A, B, nebo C; mykotické infekce jako jsou ty způsobené kvasinkami rodu Candida, parazitární infekce jako jsou ty , které způsobují schistosoma, filarie, nematoda, trichinella nebo protozoa jako trypanosomy způsobující spavou nemoc, plasmodium způsobující malarii nebo leishmanie způsobující leishmaniosu, a bakteriální infekce jako například ty, které způsobují mykobakterie, corynebakterie nebo staphylococcus. Hypersenzitivní choroby zahrnují , ale nejsou jimi omezeny, Typ I hypersensitivity, jako je kontakt s alergenem, který vede k alergii, Typ II hypersensitivity jako je u Goodpasturova syndromu a myasthenia gravis.

Terapeutické užití proteinů V regionu TCR tohoto vynálezu je založeno na korelaci mezi specifickými imunitními chorobami a preferenční expresí určitého proteinu V regionu buněčného receptoru T buněk nebo určité sekvence kodující protein V regionu TCR. Ačkoliv by předkládaný vynález neměl být

limitován určitou vědeckou teorií, V regiony TCR jsou užitečné zčásti proto, že mohou být užity k regulaci imunitní odpovědi u jednotlivců. Specificky, tam kde přítomnost nebo abnormálně vysoká exprese jednotlivého V regionu koreluje s jednotlivou imunitní chorobou, lze léčit jednotlivce neutralizací T buněk nesoucích určitý protein V regionu. Navíc zavedení proteinu V regionu TCR může ovlivnit imunosupresivní funkce stimulací regulačních T buněk, které budou specificky reagovat s T buňkami nesoucími cílový T region. Je také pravděpodobné, že proteiny V regionu TCR mohou zvyšovat protilátkovou odpověď, která bude specificky interagovat s cílovým V regionem na T buňkách a zpětně regulovat imunitní odpověď.

Kompletní proteiny V regionu antigenního receptoru T buněk předkládaného vynálezu poskytují jasné výhody v léčbě imunitních chorob. Před předkládaným vynálezem zahrnovali terapeutické možnosti imunitních chorob souvisejících se specifickými T buňkami: (a) žádnou léčbu s možným spontánním vyléčením, (b) léčbu peptidy korespondujícími k jednotlivým segmentům V regionu antigenního receptoru T buněk, (c) nespecifickou léčbu, jako je léčba steroidy nebo nesteroidními protizánětlivými agens. Nicméně, žádný z těchto přístupů nedovoluje výhody předkládaného vynálezu. Terapeutické metody předkládaného vynálezu mají jasné výhody proti předešlým metodám léčby imunitních chorob v tom, že metody předkládaného vynálezu jsou zaměřeny pouze na jednotlivou podskupinu T buněk nesoucí určitý V region a mohou být užity u různého rozsahu postižených jedinců, protože vynález umožňuje eliminaci potřeby selektovat jednotlivé peptidy vztahované k MHC haplotypům jednotlivých individuí. Metoda předkládaného vynálezu se těsněji přibližuje cíly modulace pouze těch T buněk, které mají vztah k chorobě a ušetření nebo neovlivnění jiných T buněk subjektu. Vynález tak dosahuje

vyšší specifický terapie mezi širší populací.

V preferovaném provedení může být kompletní protein V regionu antigeního receptoru T buněk užit k down-regulaci nebo eliminaci podskupin T buněk, které vykazují TCR inkorporující stejné V regiony. Proteiny V regionu antigeního receptoru T buněk mohou být užity v terapeutických situacích k modulování aktivity těch T buněk, které nesou cílový V region nebo indukují neodpovídavost v populaci aktivně odpovídajících T buněk nesoucích cílový V region. V této situaci je antigení receptor T buněk užit jako terapeutická kompozice v subjektu.

Specifické proteiny V regionu antigeního receptoru T buněk asociované s danou chorobou jsou identifikovány jakoukoli z množství technik v oboru dobře známých. Genetický přístup s použitím pacientů s myastenia gravis nebo roztroušenou sklerosou byl popsán Oksenbergem, J.R., et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:988-992.

Termínem léčba v předkládaném vynálezu je míněna "prevence", "suprese" nebo "léčba" choroby. "Prevence" zahrnuje podání protektivní kompozice před vznikem choroby. Tak, například, u zvířecího modelu experimentální autoimunitní encephalomyelitidy, EAE, úspěšné podání protektivní kompozice před podáním encephalitogenu, který indukuje chorobu, vede k "prevenci" choroby.

"Suprese" zahrnuje podání kompozice po indukci, ale před klinickou aparencí choroby. Tak, při užití EAE příkladu, úspěšné podání protektivní kompozice po injekci encephalitogenu, ale před neurologickými symptomy, vede k "supresi" onemocnění.

"Léčba" zahrnuje podání protektivní komposice po objevení se nemoci. Na příkladu EAE, úspěšné podání protektivní komposice po injekci encephalitogenu a po klinických příznacích vede k "léčbě" nemoci.

Pro měření preventivního, supresivního a terapeutického benefitu proteinu V regionu TCR předkládaného vynálezu byly měřeny jisté klinické výsledky. Zejména byla měřena alterace proliferativní odpovědi lymfocytů in vitro. Zkoušky pro měření terapeutického benefitu jednotlivých proteinů V regionu jsou v oboru známé.

Zvířecí modelové systémy, které mohou být použity ke skríningu efektivity proteinů v protekci nebo léčbě jsou dosažitelné. Systemový lupus erytematodes (SLE) je testován na susceptibilních myších jak popisuje Knight et al., 1978, J. Exp. Med., 147:1653 a Reinersten et al., 1978, 299:515. Myastenia gravis (MG) je testována na SJL/J myšších samicích indukci choroby solubilním AChR proteinem z jiných druhů jak popsal Lindstrom et al., 1988, Adv. Immunol., 42:233-284. Artritis je indukovaná na vnímavém kmenu myši injekcí II typu kolagenu jak popisuje Stuart et al., 1984, Ann. Rev. Immunol., 42:233-284. Adjuvantní artritida je indukována vnímavým krysám injekcí Mykobakterialního proteinu tepelného šoku jak popisuje Van Edan et al., 1988, Nature, 331:171-173. Thyreoiditis je indukována myším podáním thyreoglobulinu jak popisuje Maro et al., 1980, 152:1115-1120. Insulin dependentní diabetes mellitus (IDDM) se vyskytuje přirozeně nebo může být indukován u jistých kmenů myši jako jsou ty, které popsal Kanasawa et al., (1984). EAE u myši a krys poskytuje model pro MS u lidí. V tomto modelu je demyelinizační choroba indukována podáním myelin basického proteinu (MBP) jak popisuje

Paterson, P.Y., Textbook of Immunopathology, (Mischer et al., eds.), Grune and Stratton, New York, pp.179-213 (1986), McFarlin, D.E., et al., 1973, Science, 179:478-480: a Satoh, J, et al., 1987, J. Immunol., 138:179-184.

Samozřejmě, identické proteiny nemusí být účinné u lidí protože nemusí korespondovat s vhodnými místy na lidském s chorobou asociovaném TCR. Je srozumitelné, že může být požadována taková modifikace proteinové sekvence určené na zvířecím modelu, aby léčila subjekty náležící k jinému druhu včetně lidí.

4. FARMACEUTICKÉ KOMPOSICE OBSAHUJÍCÍ V REGION ANTIGENÍHO RECEPTORU T BUNEK

Proteiny a kompozice předkládaného vynálezu, nebo jejich funkční deriváty jsou vhodné pro přípravu farmaceutických komposic. Farmaceutické kompozice předkládaného vynálezu mohou být podány jakýmkoli zvířatům, u kterých jsou zkušenosti s benefičními efekty kompozice vynálezu. Přední mezi takovými živočichy jsou lidé, ačkoliv vynález nemá v úmyslu být tak omezený.

Farmaceutické kompozice předkládaného vynálezu mohou být podávány jakýmkoliv prostředky, které dosahují zamýšleného účelu. Například, podání může být paranterální, subkutánní, intravenosní, intradermální, intramuskulární, intraperitoneální, transdermální nebo bukální cestou. Alternativně, nebo konkurentně, může být podání cestou orální.

Proteiny a farmaceutické kompozice mohou být podány parenterálně bolusovou injekcí nebo graduální perfusí během

doby.

Podaná dávka bude závislá na věku, pohlaví, zdravotním stavu a váze recipienta, typu konkurentní léčby, je-li nějaká, frekvenci léčby a povaze požadovaného efektu. Dávkové rozsahy pro podání komposicí předkládaného vynálezu jsou dostatečná množství umožňující produkci požadovaného efektu, čímž je například dosažená imunitní odpověď na proteiny měřená oddálenou hypersensitivitou (DTH) nebo produkcí protilátek a signifikantní prevenci, supresi nebo léčbu imunitní choroby. Dávky by neměly být příliš vysoké, aby nezpůsobovaly vedlejší účinky, jako je nežádoucí zkřížená reakce, generalisovaná imunosuprese, anafylaktická reakce a pod.

Preferované dávky u lidí jsou v rozsahu 0.001-1 mg/kg tělesné hmotnosti.

Navíc k proteinům předkládaného vynálezu, které jsou samy farmaceuticky aktivní mohou farmaceutické komposice obsahovat vhodný farmaceuticky akceptovatelný nosič obsahující excipienty a auxiliaria, která usnadňují zapracování aktivní sloučeniny do preparátů, které mohou být užity farmaceuticky. Preferované sloučeniny zahrnují inkulsi adjuvans, jako je oxid hlinitý, nebo jiná adjuvans v oboru známá. (Viz. např. Warren et al., 1986, Ann.Rev.Immunol., 4:369-388, Chedid, L, 1986, Feder.Proc., 45:2531-2560.)

Ke zvýšení dostupnosti nebo bioaktivity mohou být proteiny inkorporovány do liposomů užitím metod a sloučenin v oboru známých.

Přípravky které mohou být podány orálně ve formě tablet a kapslí, přípravky, které mohou být podány rektálně, jako

jsou čípky, a přípravky ve formě roztoků pro injekce nebo orální podání obsahují 0.001 až 99 procent , lépe od 0.01 do 95 procent aktivní sloučeniny , společně s excipientem.

Vhodnými excipienty jsou zejména plnidla jako jsou sacharidy, například laktosa nebo sucrosa, manitol nebo sorbitol celulosové přípravky a/nebo fosforečnan vápenatý například trikalciumpfosfát nebo hydrogenufosforečnan vápenatý, stejně jako pojiva jako škrobová pasta, za užití , například kukuřičného škrobu, rýžového škrobu, bramborového škrobu, želatiny, tragantu, methylcelulosity , hydroxypropylmethylcelulosity, karboxymethylcelulosity sodné a/nebo polyvinylpyrolidonu.

Další farmaceutické preparáty , které mohou být použity orálně zahrnují zasouvací plnicí kapsle vyrobené ze želatiny, stejně jako měkké, uzavíratelné kapsle vyrobené ze želatiny a plasticizéry jako je glycerol nebo sorbitol. Zasouvací plnicí kapsle mohou obsahovat aktivní sloučeninu ve formě granulí, které mohou být smíchány s plnidly jako je laktosa, pojivy jako je škrob, a/nebo lubrikanty jako je talek nebo stearát hořečnatý a popřípadě stabilizátory. V měkkých kapslích je aktivní sloučenina preferovaně rozpuštěna nebo suspendována ve vhodné tekutině, jako jsou mastné oleje, nebo tekutý parafín. Navíc může být přidán stabilizátor.

Možné farmaceutické kompozice, které mohou být použity rektálně, například čípky, které se sestávají z kombinace jedné či více aktivních sloučenin a čípkové base. Vhodnými čípkovými basemi jsou, například, přírodní nebo syntetické triglyceridy, nebo parafinové uhlovodíky.

Navíc je také možné užít želatinové rektální kapsle, které se skládají z kombinace aktivní sloučeniny s bází. Možnými materialy pro báze jsou, například, tekuté triglyceridy, polyethylen glykol, nebo parafinové uhlovodíky.

Vhodné přípravky pro parenterální užití zahrnují vodné roztoky proteinů ve formě rozpustné ve vodě, například ve formě solí ve vodě rozpustných. Navíc, suspence proteinů může být podána jako injekce vhodné olejové suspence. Vhodná lipofilní rozpouštědla nebo vehikula zahrnují mastné oleje, například, sezamový olej, nebo syntetické estery mastných kyselin, například etyloléat nebo triglyceridy. Vodné injekční suspence obsahují substance, které zvyšují viskozitu suspence jako, například, karboxymethylcelulosu sodnou, sorbitol, a/nebo dextran. Volitelně může suspence také obsahovat stabilizátor.

Proteiny jsou připraveny užitím konvenčně farmaceuticky přijatelných vehikul pro injekční podání. Tato vehikula jsou netoxická a terapeutická, a množství formulací je dáno v Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed.) Mack Publishing Co. Easton, PA (1990). Nelimitujícími příklady excipientů jsou voda, salinický roztok, Ringrův roztok, roztok dextrosy, a Hankův vyvážený roztok. Formulace podle vynálezu mohou také obsahovat malé množství aditiv jako jsou substance udržující isotonicitu, fyziologické pH a stabilitu.

Proteiny podle vynálezu jsou preferovaně formulovány v purifikované formě zejména prosté agregátů a jiného proteinového materiálu, preferovaně v koncentraci od 1.0ng/ml do 100 mg/ml.

Účinné dávky proteinů tohoto vynálezu pro užití v prevenci,

supresi, nebo terapii imunitních chorob jsou v rozmezí od 1 ng do 100 mg/kg tělesné hmotnosti. Preferované rozmezí dávky je od 10ng do 10mg /kg tělesné hmotnosti. Ještě preferovanější rozmezí dávky je od 100ng do 1mg/kg tělesné hmotnosti.

Metody ke zvýšení účinnosti proteinů jsou v oboru známé. Tyto techniky mohou být použity v konjunkci s proteiny předkládaného vynálezu.

Následující příklady jsou nabídnuty pro ilustraci, ale nejsou limitující.

Příklady provedení vynálezu

Následující obecné techniky jsou užity v celých následujících příkladech.

1. Material a metody obecně

A. Bakterie, plasmidy a obecné metody

Escherichia coli GM 2929, methylasa negativní, a E coli LJ 24 (lac delece) (Rasmussen et al. 1991, J. Bacteriology, 173:6390-6397) byly darované Dr. Martinem Marinus-em, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA. E. coli JM 109 (Yanisch - Peron et al., 1985, Gene, 33:103-119) byly získány od Promega Corporation, Madison, WI (USA). BL21 (lon, ompT) (Wood, W. B., 1966, J. Mol. Biol. 16:118-133, Studier and Moffatt, 1986, J. Mol. Biol., 189:113-130) byly získány od Novagen, Madison, WI (USA). SG 22094 (lon, clp), SG 21163 (lon, htpr) a SG 21173 (lon, htpr, clp) byly darovány Dr. Susan Gottesman, National Institutes of Health, Bethesda, MD (USA). Tyto Gotesmanové kmeny měly deleci lacI genu. Bakterie byly

vytvořeny kompetentními pro transformaci Morrisonovou metodou 1979, Meth.Enzymology,68:326-331, nebo byly získány (DH5 alfa) od GibcoBRL,Gaitherburg,MD(USA).

pKK233-2 (Amann a Brosius,1985,Gene,40:183-190) byl získán od Pharmacia, Piscataway, NJ (USA). pBR322 (Bolivar et al.,1977,Gene, 2: 95-113) byl získán od New England Biolabs, Beverly, MA (USA). pBluescript II KS+ (Alting-Mees et al.,1992, Meth.Enzymology,216:483 - 495) byl získán od Stratagene,La Jolla,CA (USA). pDC952 obsahující argU(dnaY)gen (Lindsey et al.,1989,J.Bacteriology,171:6197-6250) byl darován Dr.Jamesem R.Walkerem, University of Texas, Austin,TX. pSE 420 (Brosius,1992, Meth.Enzymology,216:469-483) a pKK480-3 (Brosius, (1992) supra) daroval Dr.Jurgen Brosius,Mount Sinai School of Medicine, New York,NY. pUCts (Bukrinsky et al.,1988,Gene,70: 415-417) byl získán od Michaila I.Bukrinskeho přes Jurgena Brosiuse.

Plasmidové konstrukce byly získány standartními procedurami (Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,New York (1989)). DNA restrikční a modifikační enzymy byly získány od New England Biolabs, pokud není uvedeno jinak, a byly užity podle specifikací výrobce. Syntetické oligonukleotidy byly získány od Operon Technologies, Inc.,Alameda,CA (USA),není-li uvedeno jinak. Oligonukleotidy byly tepelně zpracovány smíšením ekvimolárních koncentrací komplementárních oligonukleotidů v 10 mM Tris pH 8.0, 5 mM MgCl₂ a umístěny ve 100 °C na 5 min a potom pomalu ochlazovány na 25 °C.Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla provedena (Saiki et al.,1988,Science,239:487-491) v zařazení Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cykler,užitím Gene Amp reagent kitu (The Perkin

- Elmer Corporation, Norwalk, CT (USA)). DNA sekvencování využívá dideoxynukleotidovou řetězovou terminační metodu (Sanger et al., 1977, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463-5467) užitím Sequenase kitu (U.S.Biochemical, Cleveland, OH (USA)). Všechna chemická reagens byla nejvyšší dosažené čistoty.

B. Růst a indukce buněčných kultur

Pro chemicky indukované kultury bylo použito zmražených glycerolových živných roztoků k inokulování 5-25 ml 2XYT media (16 g Bacto- Tryptone(Difco 0123), 10 g Bacto- Yeast extraktu (Difco 0127), 10g NaCl, pH 7.2-7.4, na litr vody) obsahující 6 µg/ml tetracyklinu, které byly kultivovány přes noc při 37 °C, 280 rpm. 1/100 objemu kultivované kultury pak byla užita k inokulování do každé ze dvou 125ml lahviček obsahujících 25 ml 2XYT media plus 6 µg/ ml tetracyklinu. Kultury rostly při 37°C, 280rpm dokud A_{580} nebylo 0.5-1.0 absorbančních jednotek, a pak indukovány 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyramosidu (IPTG), a kultivovány další 2 hodiny.

Pro termální indukci kultury rostly při 30 °C, 280 rpm dokud A_{580} nebylo 0.5-1.0 absorbančních jednotek. Potom byla jedna kultura udržována při 30 °C, a jiná byla indukována přesunutím do vodní lázně o 42 °C, a pak kultivována 2 hodiny. Alternativně byla kultura indukována růstem při 30 °C dokud A_{580} nebylo 0.3-0.6 absorbančních jednotek a potom byla rozdělena na dva stejné díly, jeden byl udržována na 30 °C a druhý byl kultivován při 42 °C.

K vyzkoušení výsledků indukce byly odebrány duplikátní vzorky ekvivalentní 1 ml buněk při A_{580} = 1.0 (tj. předpokládané A_{580} = 3.0, pokud bylo odebráno 333 µl kultury).

Vzorky byly centrifugovány na Eppendorfově mikrocentrifuze při 14,000 x g, 1 min, supernatant byl odstraněn a buněčné pelety byly uskladněny při -20 °C.

C. Stabilitní studie

Bakterie byly postupně naočkovány do jednotlivých kolonií a jednotlivé kolonie ze tří ploten byly inokulovány do 200 ml XYT media obsahujícího 6 µg/ml tetracyklinu. Kultura rostla do $A_{580} = 0.5-1.0$ absorbančních jednotek, a 60 ml bylo odebráno, smícháno se 40ml glycerolu a 1 ml alikvoty byly rozděleny do 100 lahviček k uskladnění při -80 °C. Zbytek kultury byl rozdělen do dvou alikvotních částí: jedna byla inkubována neindukovaná a druhá byla indukovaná přidáním IPTG nebo posunem teploty. Obě kultury rostly další dvě hodiny. Vzorky ekvivalentní 1ml kultury při $A_{580} = 1.0$ byly odebrány před a 2 h po indukci, a zkoušeny na A_{580} absorbanci, pH a produkci proteinů EIA, akrylamidovou gelovou elektroforesou a Western blottingem.

Tři lahvičky ze zmražené banky byly testovány paralelně na bakteriální růst a produkci proteinů. Každá lahvička (1ml) byla užita k inokulaci 200ml 2XYT media plus 6 µg/ml tetracyklinu, a inkubována do $A_{580} = 0.5-1.0$ absorbančních jednotek. Potom byla kultura rozdělena do dvou alikvotních částí, jedna byla inkubována neindukovaná, a druhá byla indukována chemicky nebo termálně. Vzorky ekvivalentní 1ml kultury při $A_{580} = 1.0$ byly odebrány z obou kultur před a 2 h po indukci a zkoušeny jak je popsáno výše.

Pro stabilitní studie byly odebrány 1 ml alikvoty z jedné ze tří paralelních kultur před indukci, ředěny 1/1000 v 2XYT mediu a 20 µl nebo 200 µl bylo inokulováno do 200 ml 2XYT media

plus tetracyklin, a kultivováno do $A_{580}=0.5-1.0$ absorbančních jednotek. Potom byla kultura rozdělena do dvou alikvotních částí, jedna byla indukována, a obě byly kultivovány další dvě hodiny. Vzorky ekvivalentní 1ml kultury při $A_{580}=1.0$ byly odebrány před a 2 h po indukci a zkoušeny jak je popsáno výše.

D. Frakcionace buněk.

Buňky byly peletovány centrifugací 7000 x g, 7 min a supernatant (kultivační medium) byl recentrifugován při 14000 x g, 5 min, před elektroforesou. Buněčné pelety byly resuspendovány ve 20% (hmotn./objem) sacharóze, 0.3 M Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA za užití 1/5 inicialního objemu kultury, inkubovány při 25 °C 15 min a centrifugovány při 6000 x g, 7 min. Supernatant byl oddělen a proteiny uložené v periplasmě byly uvolněny osmotickým šokem (Nossal and Heppel, 1966, J. Biol. Chem., 241:3055-3062) resuspendováním do 1/5 originálního objemu studené vody a inkubováním při 0 °C, 10 min. Po centrifugaci při 9000 x g, 10 min byl odebrán supernatant (periplasmatická frakce), buněčné pelety byly resuspendovány do 1X TST (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 1ml EDTA, 10ml/litr Tween 20), rozrušeny ultrazvukem, centrifugovány při 12000 x g, 15 min a supernatant byl uložen (solubilní frakce cytosolu).

E. Polyakrylamidová gelová elektroforesa

Zmražené buněčné pelety *E. coli* byly resuspendovány v 70 μ l vody intenzivním vortexováním nebo sonikací při 0 °C (Sonic Dismembrator, Model 301, ARTEK Systems Corporation) třikrát vždy po dobu 5 sekund, při nastavení síly 0.4. Rozrušené buňky byly smíchány s 70 μ l 2X plnicího pufru (125mM

Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% β -merkaptoetanol, 0.002% bromfenolová modř) (Laemmli, 1970, Nature, 227:680-685). Vzorky byly inkubovány při 100 °C, 5 min, centrifugovány při 14000 x g, 30 sekund a 10-15 μ l alikvoty byly zavedeny do připraveného 16% nebo 10-20% akrylamidového Tricine gelu (Novex, San Diego, CA(USA)) a vyvíjeny v reservoárovém pufru od stejné firmy. Elektroforesa byla při konstantním napětí 125 V, nebo 45 mA konstantního proudu, na dva gely, asi 2 h, dokud bromfenolové modré barvivo nebylo na konci gelu. Markery byly předem označené standardy proteinů nízké molekulární hmotnosti (SE 130024, Integrated Separation Systems, Natick, MA (USA)) užité v 1 μ l na dráhu. Gely byly barveny přes noc v 10% kyselině octové, 25% metanolu, 0.025% Coomassie Brilliant Blue R.

F. Western blott analyza

Po separaci SDS-PAGE byly proteiny imunodetekovány (Towbin et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:4350-4354) pomocí elektrotransferu do polivinyliden difluoridových (PVDF) membrán (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA(USA)) užítím Semi-Dry elektroblotteru (Integrated Separation Systems). Proteiny byly transferovány při 10 mA na cm² membrány 1-3 h a membrány byly blokovány přes noc v blokujícím pufru (1X PBS, 2% sušené mléko, 0.1% Tween-20).

Membrány byly promývány třikrát, pokaždé 5 min v 1X PBS, 0.1% Tween-20, následovalo trojí promývání, pokaždé 5 min. v 1X PBS a pak byly ponořeny do křenová peroxidasa (HRP)-konjugovaná monoklonální anti-V β 5.3 protilátka (13A2-HRP, 0.25 mg/ml) ředění 1:3000 v 1 X PBS, 0.1% Tween-20. Po jemném promíchání po dobu 2 hodin byly membrány promývány jak je popsáno výše, a proteiny byly visualisovány

Enhanced Chemiluminiscence assay (Amersham, Arlington Heights, IL(USA)) podle instrukcí výrobce. Expozice filmu byla od 5 sekund do 1 minuty.

G. Enzymová immunoesej.

Zmražené buněčné pelety byly resuspendovány intenzivním vortexováním v 20 μ l 8M močoviny Tris-HCl, pH 8.5, (Marston and Hartley, 1990, Meth. Enzymology, 182:264-276) a V β 5.3 byl kvantifikován enzymoimmunoesejí následovně:

Nunc Immuno Maxisorp plotny (VWR 62409-002) byly potaženy 100 μ l/jamku 4C2 IgG v 4 μ g/ml v PBS, a přes noc uskladněny při 4 °C. Potahovací roztok byl odstraněn a blokuující pufr (1% kaseinový hydrolyzáát v PBS, 0.05% Tween-20) byl přidán v množství 200 μ l/jamku. Plotny byly inkubovány při pokojové teplotě 2 h, 150 rpm a potom promývány 3x promývacím pufrem (PBS, 0.05% Tween - 20). Vzorky (ředěné 1/2000 nebo 1/32000) a V β 5.3 standardy v blokuícím pufru byly přidány v množství 100 μ l/jamku, a inkubovány při pokojové teplotě 90 min, 150 rpm. Plotny byly promývány 3x promývacím pufrem, a HRP-konjugáty anti-V β 5.3 monoklonální protilátky (13A2-HRP) ředěné 1/500 v blokuícím pufru plus fetální hovězí serum byly přidány v množství 100 μ l/jamku (0.5 μ g/ml). Plotny byly inkubovány při pokojové teplotě 90 min, 150 rpm, třikrát promývány a byl přidán O-fenylenediamin (OPD) substrát v množství 100 μ l/jamku. Po 30 minutách byla reakce ukončena přidáním 50 μ l 2N H₂SO₄ na jamku. Absorbance byla měřena při 490 nm minus absorbance pozadí při 650 nm. Prázdné jamky neobsahovaly vzorek.

2. KONSTRUKCE PLASMIDŮ

Příklad 1

Konstrukce pK2D

Prvním bodem pro expresi proteinů V regionu antigenního receptoru T buněk vynálezu byla konstrukce plasmidu, který obsahuje vlastní regulační elementy pro expresi proteinů V regionu antigenního receptoru T buněk. Tyto elementy zahrnují promotor, dva terminátory transkripce, zdroj replikace pro stabilní replikaci v bakteriích. Navíc, protože jsou regulační oblasti asociované s výrobou proteinů, pro které je možnou indikací použijí in vivo v terapeutické podobě, byl vybrán gen kodující resistenci na tetracyklin pro usnadnění selekce plasmid nesoucích buněk. Konečně, úvodní expresní vektor vyžaduje multiplikovatelné klonující místo, strategicky umístěné k usnadnění klonování preferovaných kodujících regionů vynálezu do expresního vektoru. Následující příklad popisuje unikátní úvodní plasmid vynálezu.

Prvním bodem konstrukce preferovaného expresního vektoru byl pKK233-2 (4.6 kb), popsáný infra. NcoI restrikční místo bylo konvertováno na SpeI místo následovně: pKK233-2 byl natráven NcoI a výsledný 5' přesahující konec byl odstraněn inkubací s "mung bean" nukleasou při 25 °C po 30 min. Plasmidy byly extrahovány dvakrát fenol-chloroformem, precipitovány etanolem v přítomnosti 2 M octanu amonného, a resuspendovány ve vodě. Po defosforylaci bakteriální alkalickou fosfatásou (GibcoBRL) byl vektor ligován na syntetický SpeI linker (1085, New England Biolabs) a ligační směs byla transformována do DH5a kompetentních buněk k získání vektoru pKK233-2A.

Dále byl tetracyklinový gen znovu zaveden následovně: pKK233-2A (4.6 kb) byl natráven EcoRI a SalI za získání dvou fragmentů, 279 bp a 4321 bp. Dva fragmenty byly separovány gelovou elektroforesou na agarose, a delší fragment byl

purifikován z agarosy užitím Geneclean kitu (BIO 101, La Jolla, CA(USA)). 651-bp fragment obsahující amino-terminální kodující region tetracyklinového genu byl excidován EcoRI a SalI z pBR322, a ligován na 4321-bp fragment pKK233-2A. Výsledný plasmid pK2B (4.97 kb) dával resistenci na tetracyklin E. coli DH5a buňkám, a byl dále modifikován k delecí části β -laktamasového genu a konversi HindIII místa do SacII místa následovně:

DNA fragment v rozsahu od jediného Spe I místa do 3' konce transkripčního terminátoru byl PCR syntetizován užitím pK2B jako templátu. 5' "sense" primer obsahoval následující rozpoznávající sekvenci pro SpeI, PstI a SacII v 5' -3' směru:

5' - TATAATGACTAGTCGCTGCAGCCAACCGCGG-3' (SEQ ID NO 1)

3' "antisense" primer obsahující ScaI místo podtržen:

5' - GTCCTAGAGTACTGAGCGGATAC - 3' (SEQ ID NO 2)

1 ng pKB DNA templátu byl smíchán v reakčním objemu obsahujícím 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 100 μ g želatiny, 200 μ M každého deoxynukleotidu (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 μ M každého ze dvou primerů, a 2.5 jednotkou AmpliTaq DNA polymerasy. Finální reakční objem byl 100 μ l, překrytý 100 μ l minerálního oleje. DNA byla denaturována při 95 °C 2 min, a amplifikace byla dosažena 30 cykly 1 min denaturace při 95 °C, 1 min při 60 °C pro tepelné zpracování a 1 min při 72 °C pro extenzi primeru. Amplifikovaná DNA byla analyzována na 1% agarosovém gelu v 40 mM Tris-HCl pH 7.8, 5 mM Na Acetatu, 1 mM EDTA.

Výsledný 485-bp PCR syntetizovaný fragment byl tráven SpeI a ScaI, a ligován na 4129-bp fragment, který byl získán digescí pK2B SpeI a ScaI za vytvoření plasmidu nazvaného pK2C.

Plasmid pK2C (4.6 kb) byl dále modifikován tak , aby obsahoval multiplikované klonující místo. Nejprve byl pK2C natráven SpeI a SacII a ligován na dvojřetězcový syntetický oligonukleotid obsahující 15 restrikčních míst. Toto multiplikované klonující místo (MCS) bylo formováno tepelným zpracováním ekvimolárních koncentrací dvou komplementárních syntetických oligonukleotidů, 91 a 97 bp dlouhých, majících následující sekvenci:

```
5'- GGCTCGAGCCTAGGCTGCAGCCCGGGCGCGCGCGGCCCGCAGGCC
TTAATTAAGAGCTCCGGACCGCACAAATGTGGGCGCGCCCTTAAGA -3'
[SEQ ID NO 3]
5'- CTAGTCTTAAGGGCGCGCCACATTGTGCGGTCCGGAGCTCTTAA
TTAAAGGCCTGCGGCCGCGCGCCCCGGGCTGCAGCCTAGGCTCGAG
CCGC -3' [SEQ ID NO 4]
```

MCS koduje následující místa pro restrikční enzymy: SpeI, AflIII, AscI, DraIII, RsrII, SacI, PacI, StuI, NotI, BssHII, XmaI, PstI, AvrII, XhoI a SacII. Ligační směs byla transformována do metyláso-negativní *E. coli* GM2929. Výsledný plasmid pK2D (4.67 kb) byl částečně sekvencován ,aby se zajistila integrita in vitro syntetizovaných regionů.

Výsledky

Počátečním plasmidem byl pKK233-2, který obsahoval následující elementy:trc promotor (Brosius et al.,(1985) supra),který je podobný tac promotoru odvozenému fúzí 10

regionu lacUV5 promotoru s -35 regionem tryptofanového promotoru (de Boer et al., (1983), supra, Amann et al., (1983), supra). Plasmid také obsahuje ribosomové vazebné místo následované klonujícím místem pro tři unikátní restrikční enzymy (NcoI, PstI a HindIII), následované transkripčními terminátory rrnB ribosomálního RNA operonu E.coli (Brosius et al., 1981, Plasmid, 6:112-118). Navíc, pKK233-2 obsahuje β -laktamosový gen pro ampicilinovou resistenci, pBR322 zdroj replikace, a malý nefunkční karboxy - terminální fragment z genu tetracyklinové resistance.

pKK233-2 byl modifikován tak, aby bylo zrušeno NcoI místo, obnoven gen tetracyklinové resistance, oddělen segment β -laktamosového kodujícího regionu (tak inaktivující gen), a připojeno multiplikované klonující místo sestávající z 15 restrikčních míst, a tak byl vyprodukován pK2D.

Příklad 2

Plasmid pK2D byl dále modifikován k inkorporování buď pelB signální sekvence z *Erwinia carotovora* (Lei et al., 1987, J. Bacteriology, 169:4379-4383) ,nebo termostabilní enterotoxin II (STII) signální sekvence z *Escherichia coli* (Morioka - Fujimoto et al., 1991, J. Biol. Chem., 266:1728-1732)

Konstrukce pK-pelB

Plasmid pK2D (4.67 kb) byl následovně zpracován tak, aby zahrnoval ribosomové vazebné místo (Shine et Dalgarno, 1974 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71:1342-1346, Shine et Dalgarno, 1975, Nature, 254:34-38, Steitz and

Jakes, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:4734-4738) a pelB signální sekvenci z E. carotovora (Lei et al., (1987) supra) k vytvoření plasmidu pK-pelB (4.74 kb) :

pK2D byl tráven SpeI a SacI umístěnými v MCS, a vektor byl ligován do dvou komplementárních syntetických oligonukleotidů, 103bp a 95bp dlouhých, majících sekvence uvedené níže. Tiché mutace (malá písmena) byly uvedeny do pelB sekvence, aby se vytvořila NcoI restrikční místo (podtržené), a tak se usnadnilo následné subklonování Vβ 5.3 genové sekvence.

```
5' - CTAGTAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACC
TATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCA
GCcATGGCCGAGCT - 3' [SEQ ID NO 5]
```

```
5' - CGGCCATgGCTGGTTGGGCAGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCT
GCCGTAGGCAATAGGTATTTTCATTATGACTGTCTCCTTGAAATAGA
ATTTA - 3' [SEQ ID NO 6]
```

Konstrukce pK-STII

Plasmid pK2D byl následně zpracován tak, aby obsahoval ribosomové vazebné místo a signální sekvenci termostabilního enterotoxinu (STII) E. coli (Morioka -Fujimoto et al., (1991), supra):

pK2D byl tráven SpeI a DraIII umístěnými v MCS a vektor byl ligován do dvou komplementárních syntetických oligonukleotidů, 105bp a 98bp dlouhých, majících sekvence uvedené níže. Tiché mutace (malá písmena) byly uvedeny do STII sekvence, aby se vytvořila MluI a DraIII restrikční místa

(podtržená), a tak se usnadnilo následné subklonování V β 5.3 genové sekvence.

5' - CTAGTAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAAAAGAA
TATAGCATTCTACTAGCTTCAATGTTTCGTCTTCTCTATTGCAACTA
ACGCgTACGCaCATT - 3' [SEQ ID NO 7]

5' - GtGCGTAcGCGTTAGTTGCAATAGAGAAGACGAACATTGAAGCT
AGTAGGAATGCTATATTCTTTTTCATTATGACTGTCTCCTTCAAATA
GAATTA - 3' [SEQ ID NO 8]

Příklad 3

Plasmidy obsahující signální sekvence z Příkladu 2 supra byly dále modifikovány tak, aby obsahovaly dva regulační elementy.

Konstrukce pKT-pelB

Plasmid pK-pelB byl dále modifikován k vytvoření pKT-pelB (4.8kb) tak, aby obsahoval dva regulační elementy upstream od pelB leaderu. Tyto elementy jsou translační enhancery z bakteriofágového T7 genu 10 (g10), mini-cistron ATG TAT CGA TTA AAT AAG GAG GAA TAA (SEQ ID NO.28), kodující pro 8 aminokyselinový zbytek. Inserce dvou regulačních elementů byla dosažena digescí pK2D SpeI a SacI, následovanou ligací vektoru do syntetických oligonukleotidů kodujících pro g10 sekvenci, ribosomové vazebné místo, mini-cistron a pelB leader, v 5' - 3' směru. Oligonukleotidy byly syntetisovány jako

dvě komplementární sady 71-89 merů, které mohou být ligovány cestou komplementárních 9bp přesahů mezi páry oligonukleotidů. Dva komplementární páry oligonukleotidů byly označeny pár A (oligos J5A+J6A, 89bp a 76bp) a pár B (oligos J5B + J6B, 71bp a 76bp), a mají následující sekvenci:

J5A

5' - CTAGTCCGGAATTGGGCATCGATTAACCTTTATTATTAATAAAATTA
AGAGGTATATATTAATGTATCGATTAATAAGGAGGAATAAATA - 3' [SEQ ID NO 9]

J6A

5' - CTCCTTATTTAATCGATACATTAATATATACCTCTTAATTTTTA
ATAATAAGTTAATCGATGCCCAATTCCGGA - 3' [SEQ ID NO 10]

J5B

5' - ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTC
GCTGCCCAACCAGCCATGGCCGAGCT - 3' [SEQ ID NO 11]

J6B

5' - CGGCCATGGCTGGTTGGGCAGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCTG
CCGTAGGCAATAGGTATTTTATTATTTC - 3' [SEQ ID NO 12]

Konstrukce pKT-STII

Plasmid pK-STII byl dále modifikován k vytvoření pKT-STII (4.8kb) tak, aby obsahoval stejné dva regulační elementy jako pKT-pe1B. pK2D byl tráven SpeI a DraIII a vektoru byl ligován do syntetických oligonukleotidů kodujících pro gl0 sekvenci, ribosomové vazebné místo, mini-cistron a STII leader, v 5' - 3' směru. Oligonukleotidy byly syntetisovány jako dvě komplementární sady 73-89 merů, které mohou být ligovány cestou komplementárních 9bp přesahů mezi páry oligonukleotidů. Dva komplementární páry oligonukleotidů byly označeny pár

A (oligos J5A+J6A, 89bp a 76bp) a pár B (oligos J5C + J6C, 73bp a 76bp), a mají následující sekvenci:

J5A

5' - CTAGTCCGGAATTGGGCATCGATTAACCTTATTATTAAAAATTAA
AGAGGTATATATTAATGTATCGATTAATAAGGAGGAATAAATA - 3' [SEQ ID NO 9]

J6A

5' - CTCCTTATTTAATCGATACATTAATATATACCTCTTTAATTTTA
ATAATAAAGTTAATCGATGCCCAATTCCGGA - 3' [SEQ ID NO 10]

J5C

5' - ATGAAAAGAATATAGCATTCTACTAGCTTCAATGTTCTGCTT
CTCTATTGCAACTAACGCGTACGCACATT - 3' [SEQ ID NO 13]

J6C

5' - GTGCGTACGCGTTAGTTGCAATAGAGAAGACGAACATTGAAGC
TAGTAGGAATGCTATATTCTTTTTCATTATTTATTC - 3' [SEQ ID NO 14]

Příklad 4

Konstrukce pK-pelB-V β 5.3

Dalším krokem v expresi proteinů V β 5.3 antigeního receptoru T buněk byla inkorporace V β 5.3 sekvence do plasmidů obsahujících signální sekvence jak je popsáno v Příkladu 2 supra.

Kompletní nukleotidová sekvence V β 5.3 byla generována následovně: DNA sekvence V β 5.3 klonu 12A1 byla originálně

publikována Leidenem et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:4456-4460) a později částečně opravena (Leiden et al., 1986, Molec. Cell Biol., 6:3207-3214). Tento klon 12A1 postrádal nukleotidy kodující pro čtyři N-terminální aminokyselinová residua, a navíc, vyvozená N-terminální aminokyselinová residua klonu 12A1 nebyla správná. N-terminální aminokyselinové sekvence V β 5.3 (HPB-ALL) byly publikované Jonesem et al., 1985, Science, 227:311-314) bez specifikace prvního N-terminálního aminokyselinového zbytku, který bylo později určen jako glycin (Jeff Leiden, nepublikováno). Užitím dřívějších informací o sekvenci byl rekonstruován kompletní V β 5.3 rekombinantními DNA technikami. Výsledný plasmid (pBB-V β 5.3) byl zdrojem V β 5.3 sekvence pro následující příklady. Kompletní nukleotidová sekvence kodující pro V β 5.3 a předpokládaná aminokyselinová sekvence byly publikoval nověji Plaza et al., (1991, J. Immunol., 147:4360-4365). (Viz. také Obr. 1, SEQ ID NOS. 25, 26 a 27 zde).

V β 5.3 byl PCR syntetizován užitím pBB-V β 5.3 (6.2kb) jako templátu. 5' "sense" primer obsahoval místo pro restrikční enzym NcoI (podtržené):

5' - TAATTAGCCATGGCCGGCGTAACCCAATCTCCG - 3' [SEQ ID NO 15]

3' "antisense" primer byl komplementární k regionu "downstream" od PstI místa vektoru:

5' - CCAGTGCCAAGCTTGCATGCC - 3' [SEQ ID NO 16]

Výsledný V β 5.3 fragment byl tupě zakončen užitím Klenow fragmentu DNA polymerasy I, a ligován do defosforylovaného EcoRV místa pBluescript II KS+ za získání plasmidu pBL-pelB-V β 5.3. V β 5.3 insert byl excidován digescí NcoI a PstI, purifikován z agarosy, a ligován do NcoI a PstI míst pK-pelB, za získání plasmidu pK-pelB-V β 5.3 (5kb).

Konstrukce pK-STII-V β 5.3

V β 5.3 byl PCR syntetizován užitím pBB-V β 5.3 (6.2kb) jako templátu. 5' "sense" primer obsahoval místo pro restriční enzym MluI (podtržené):

5' - GAAATTAACGCGTACGCAGGCGTAACCCAATCTC - 3' [SEQ ID NO 17]

3' "antisense" primer byl komplementární k regionu "downstream" od PstI místa vektoru:

5' - CCAGTGCCAAGCTTGCATGCG - 3' [SEQ ID NO 18]

Výsledný V β 5.3 fragment byl tupě zakončen užitím Klenow fragmentu DNA polymerasy I, a ligován do defosforylovaného EcoRV místa pBluescript II KS+ za získání plasmidu pBL-STII-V β 5.3(5 kb).

Konstrukce pK-STII-V β 5.3

V β 5.3 byl PCR-syntetizován za použití pBB-V β 5.3 (6,2 kb) jako templátu. 5'-"sense" primer, obsahující MluI restriční enzymové místo, podtrženo:

5'-GAAATTAACGCGTACGCAGGCGTAACCCAATCTC - 3' [SEQ ID NO 17]

3'"antisense"primer byl komplementární k downstream oblasti PstI místa ve vektoru:

5'-CCAGTGCCAAGCTTGCATGCC - 3' [SEQ ID NO 18]

Výsledný V β 5.3 fragment byl tupě zakončen Klenovovým fragmentem DNA polymerasy I a ligován do deforforilylovaného EcoRV místa pBluescript II KS+ za získání plasmidu pBL-STII-V β 5.3. V β 5.3 insert byl excidován digescí MluI a PstI, purifikován z agarosy, a ligován do MluI a PstI míst

pK-STII za získání plasmidu pK-STII-V β 5.3 (5kb).

Výsledky

V β 5.3 fuzovaný s pelB nebo STII leadery byl exprivován v *E.coli* JM 109 (tabulka 1). Indukce byla 2 h a výtěžky V β 5.3 byly měřeny EIA.

Tabulka 1

Expresse a kompartmentace V β 5.3

Kompartment	pK-pelB-V β 5.3		pK-STII-V β 5.3	
	0 mM IPTG	1 mM IPTG	0 mM IPTG	1 mM IPTG
Supernatant	0 μ g/ml	1.3 μ g/ml	0.5 μ g/ml	2.2 μ g/ml
Periplasma	0.9	4.6	N.D.	5.5
Cytosol	9.9		2.0	
	mimo stupnici (1:40)		mimo stupnici (1:40)	

Oba leadery byly funkční, ačkoliv většina exprivovaného proteinu byla lokalizována intracelulárně.

Příklad 5

Tento příklad upřesňuje plasmid obsahující leader sekvenci a dva regulační elementy (gl0 a mini-cistron) , jakož i V β 5.3 sekvenci.

Konstrukce pKT-pelB-V β 5.3

Plasmid pKT-pelB-V β 5.3 byl konstruován excisí V β 5.3

insertu z pK-pelB-V β 5.3 užitím NcoI a PstI , a ligací do NcoI a PstI míst pKT-pelB.

Konstrukce pKT-STII-V β 5.3

Plasmid pKT-STII-V β 5.3 byl konstruován podobně excisí V β 5.3 insertu z pK-STII-V β 5.3 užitím MluI a PstI a ligací do MluI a PstI míst pKT-STII.

Všechny následující plasmidové konstrukty užívají STII signální sekvenci. Proto tam, kde není signální sekvence specifikována, je myšleno užití STII sekvence.

Výsledky

pKT-V β 5.3

Plasmid pK-STII-V β 5.3 (Příklad 4) byl modifikován tak, aby obsahoval dva regulační elementy "upstream" od STII leaderu, a tak vytvořil pKT-V β 5.3. Těmito elementy jsou translační enhancer z bakteriofágového T7 genu 10 (g10), a mini-cistron kodující 8 aminokyselinových residuí. U obou elementů bylo demonstrováno, že zvyšují účinnost translace mnohých genů (Schoner et al., 1984 Proc. atl. Acad. Sci. USA, 81:5403-5407, Schoner et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:8506-8510, Olins et al., 1988, Gene, 73:227-235, Olins a Rangwala, 1989, J. Biol. Chem., 264:16973-16976).

pKT-V β 5.3 poskytoval 8 krát vyšší proteinový výnos než pK-STII-V β 5.3 (Příklad 4) v E.coli JM109 za podmínek IPTG indukce. Uvedené EIA hodnoty jsou přibližné vzhledem k nedostupnosti čistých V β 5.3 standartů v této době. pKT-V β 5.3 se ukázal stabilním v E. coli JM109.

Příklad 6

Konstrukce pKTB-V β 5.3

Další modifikace pKT-V β 5.3 (Příklad 5) pro sekretovanou expresi vyžadovala eliminaci potřeby IPTG pro indukci. Existence *lacI*^s genu kodujícího pro teplotně sensitivní lac represor (Bukrinsky et al., 1988, *Gene*, 70:415-417) umožnila kontrolu genové exprese z *trc* promotoru zvýšením teploty z 30 °C na 42 °C. Toto by mělo předejít potřebě užití IPTG nebo bakteriálních kmenů nesoucích *lacI* nebo *lacI*^q geny.

lacI^s gen byl excidován z pUCts digescí EcoRI. 1.7 kb fragment obsahující celý *lacI*^s kodující region a jeho asociované regulační elementy, doprovázené vektorovou sekvencí, byly tupě zakončeny Klenowem, a ligovány do defosforylovaného ScaI místa, lokalizovaného "downstream" od *rrnB* operonu v pKT-V β 5.3, za vzniku plasmidu pKTB-V β 5.3 (6.8kb). Orientace *lacI*^s genu byla určena restriktivním mapováním.

Výsledky

lacI^s gen byl insertován v jedné nebo druhé orientaci "downstream" od *rrnB* transkripčních terminátorů v pKT-V β 5.3 za vytvoření pKTB-V β 5.3 (Obr.2). Tento byl exprivován v *E. coli* LJ24 (*lacI* delece) a protein byl analyzován Coomassie Blue barvením na akrylamidovém gelu (Laemmli, (1970), supra) a Western blotem (Towbin et al., (1979), supra). Jedna orientace *lacI*^s genu (transkripční směr směrem k Amp³ regionu) jasně vedla k vyššímu výnosu V β 5.3 než reversní orientace.

Putativní V β 5.3 proužek získaný z extraktů všech buněčných pelet byl elektrotransferován do Immobilon-P membrán a visualisován Coomassie Blue barvením. Proužek byl excidován

a podroben NH₂- terminálnímu aminokyselinovému sekvencování (Matsudaira, 1987, J. Biol. Chem., 262:10035-10038) za výnosu všech 10 aminokyselinových residuí. Toto precisně ukázalo sekvence N-terminálních 10 aminokyselinových residuí zpracovaného Vβ 5.3, t.j. žádné leader sekvence nebyly detegovány.

Plasmid byl také exprivován termální indukci ve třech různých bakteriálních kmenech, kde každý z nich obsahoval vyšší hladiny endogénního lac represoru, t.j. LJ24<DH5 alfa<JM109. Supernatanty z indukovaných kultur byly zkoušeny na Vβ 5.3 expresi EIA (Tabulka 2).

Tabulka 2

pKTB-Vβ5.3 exprese v různých bakteriálních kmenech

Buňky byly indukovány 2 h a výtěžky Vβ5.3 (μg/ml) byly měřeny v supernatantu kultury

Plasmid	regulace	E.coli host.	indukce	neinduk.	induk.
pKTB-Vβ5.3	<i>lactS</i>	JM109 (<i>lacI^s</i>)	42°C	N.D.	0.5
pKTB-Vβ5.3	<i>lactS</i>	DH5α (<i>lacI</i>)	42°C	N.D.	5.0
pKTB-Vβ5.3	<i>lactS</i>	LJ24 (<i>ΔlacI</i>)	42°C	N.D.	5.2
pKT-Vβ5.3	<i>lacI^s</i>	JM109	2mM IPTG	0	0.9
pKT	<i>lacI^s</i>	JM109	42°C	N.D.	0

Data jsou v souladu s Western blot pozorováním a předpokládanými výsledky, t.j. vyšší expresní hladina byla dosažena v LJ24 (lacI) a nižší v JM 109 (lacI^q). Poměrně nízká množství Vβ 5.3 měřená v supernatantu kultury vycházejí z faktu, že E.coli běžně nesecernuje proteiny do media. Jak ukazuje Tabulka 1, většina exprivovaného Vβ 5.3 je zadržována v periplasmě.

DNA sekvencování lacIts genu

Celá kodující sekvence teplotně indukovatelného lacIts genu plus "upstream" 80 nukleotidů včetně promotoru byla sekvencována a srovnána s publikovanými sekvencemi IPTG-indukovatelného lacI genu (Farabaugh, 1978, Nature, 274:765-769). Promotorový region byl identický k témuž u lacI, ale ne lacI^q genu (Calos M.P, 1978, Nature, 274:762-765).

lacIts genová sekvence vykazovala otevřený čtecí rámeček 1080 nukleotidů kodujících 360 aminokyselin, a lišila se od lacI genu v nukleotidu #559 (s odkazem na první nukleotid start kodonu), který byl změněn z G na A, tak způsobující změnu aminokyselinového zbytku #187 z glycinu (GGC) na serin (AGC). Tato změna jediného aminokyselinového zbytku uděluje termální sensitivitu lac represorovému proteinu.

Navíc, publikované sekvence lacI genu (Farabaugh, (1978) supra), stejně jako sekvence objevená v Genebank (lokus ECOLAC) obsahují chybu v pozici #857 :nukleotid #857 by měl být T místo C, který by měl tvořit zbytek #286 kodující pro Leucin (TTA) místo Serinu (TCA). Přejechod C-T vkládá HpaI místo do 3^o konce lacI genu, který byl dříve ukázán restriční mapováním (Brosius, 1992. Meth. Enzymology., 216:469-483). Mělo

by být zmíněno, že u Farabaugh, (1978) supra, je stejný kodon (TCA) chybně popsán jako kodující Leucin místo Serinu.

Příklad 7

Konstrukce pKTB

Plasmid pKTB-V β 5.3 (6.7kb) byl tráven SalI a PstI, a 5.42kb fragment byl purifikován z agarosy užitím GeneClean Kitu (BIO 101). Plasmid pKT-STII (4.8kb) byl tráven SalI a PstI a 1.15kb fragment byl podobně purifikován a ligován na 5.42kb fragment za vzniku plasmidu pKTB (6.56kb).

Příklad 8

Konstrukce pKB-V β 5.3

Tento plasmid je identický k pKTB-V β 5.3 minus dva regulační elementy, t.j. g10 translační enhancer a mini-cistron. Plasmid pKTB (6.56kb) byl tráven SalI a PstI a větší fragment (5.4kb) byl purifikován z agarosy užitím GeneClean Kitu (BIO 101). Plasmid pK-V β 5.3 (4.9kb) byl tráven SalI a PstI a 1.3kb fragment byl stejně purifikován a ligován na 5.4 kb fragment za vzniku plasmidu pKB-V β 5.3 (6.7kb).

Výsledky

pKB-V β 5.3

Jak je diskutováno výše, přidání dvou regulačních elementů, t.j. g10 genového segmentu a mini-cistronu vykazuje zvýšení V β 5.3 výnosu za podmínek IPTG indukce. Chtěli jsme odstranit tyto dva elementy z pKTB-V β 5.3 vektoru a znovu přezkoušet výnos za podmínek termální indukce. Srovnání pKTB-V β 5.3 a pKT-V β 5.3 akrylamidovou elektroforesou a Western blottingem ukázalo, že výnos V β 5.3 byl neovlivněn

odstraněním těchto dvou elementů. EIA měření ureových extraktů celých buněk ukázalo, že pKB-V β 5.3 produkuje více proteinu než pKTB-V β 5.3, je-li exprimován v E. coli LJ24.

Tabulka 3

Exprese V β 5.3 v různých bakteriálních kmenech

Plasmid	LJ24	SG22094	SG21163	SG21173
pKTB-V β 5.3 + leader + g10/MC	90	80	20	30
pKB-V β 5.3 + leader - g10/MC	110	50	40	20
pKTBi-V β 5.3 - leader + g10/MC	6	100	100	100
pKBi-V β 5.3 - leader -g10/MC	10	170	130	390

indukční perioda: 2 h při 42 °C

objem kultury: 25 ml

Leader? STII

g10: T7 gen10

MC: minicistron

vzorky: extrakty celých buněk moči

V β 5.3 výtěžky (mg/litr), založené na jednotky/ml aproximací, měřeno pomocí EIA. 1 mg V β 5.3 je přibližně ekvivalentní 1 x 10⁷ jednotek.

Plasmid pKB-V β 5.3 byl demonstrován stabilním pro fermentaci.

Příklad 9

Konstrukce pKB

Plasmid pKTB (6.56kb) byl tráven Sall a PstI , a velký fragment (5.4kb) byl purifikován z agarosy užitím GeneClean Kitu (BIO 101). Plasmid pK-STII (4.75kb) byl tráven Sall a PstI a 1.1 kb fragment byl podobně purifikován a ligován na 5.4 kb fragment za vzniku plasmidu pKB (6.5kb).

Příklad 10

Konstrukce pKTBi

Tento plasmid je identický k pKTB minus STII signální sekvence. pKTB (6.56kb) byl tráven SpeI a XmaI a ligován do dvojřetězcového syntetického oligonukleotidu kodujícího pro gl0 translační enhancer, ribosomové vazebné místo a mini-cistron obsahující druhé ribosomové vazebné místo. Restrikční místa pro NcoI, DraIII a XmaI byla označena na 3' konci. Dva komplementární oligonukleotidy měly následující sekvence:

```
5'-CTAGTCCGGAATTGGGCATCGATTAAC TTTATTATTA AAAATTA  
AAGAGGTATATATTAATGTATCGATTAATAAGGAGGAATAAACC  
ATGGCACATTGTGCGGTCCGC - 3' [SEQ ID NO 19]
```

```
5'-CCGGGCGGACCGCACAATGTGCCATGGTTTATTCCTCCTTATTTA  
ATCGATACATTAATATATACCTCTTTAATTTTAATAATAAAGTTA  
ATCGATGCCCAATCCGGA - 3' [SEQ ID NO 20]
```

Příklad 11

Konstrukce pKBi

Tento plasmid je identický k pKB minus STII signální sekvence. pKTB (6.56kb) byl tráven SpeI a DraIII a ligován do dvojřetězcového syntetického oligonukleotidu obsahujícího ribosomové vazebné místo a NcoI a DraIII místa označená na 3' konci. Dva komplementární oligonukleotidy měly následující sekvence:

5'-CTAGTAAATTATATTTAAAGGAGGAATAAACCATGGCACATT-3' [SEQ ID NO 21]

5'-GTGCCATGGTTTATTCTCCTTTAAATATAATTTA-3' [SEQ ID NO 22]

Příklad 12

Konstrukce pKTBi-Vβ 5.3

Tento plasmid je identický k pKTB-Vβ 5.3 minus STII signální sekvence. pKTBi (6.4kb) byl tráven XmaI a NcoI a ligován do PCR syntetizovaného Vβ 5.3 užitím pKTB-Vβ 5.3 jako templátu. 5' "sense" primer obsahoval místo pro restriční enzym NcoI (podtržené):

5' - TATAGTCCATGGGCGTAACC - 3' [SEQ ID NO 23]

3' "antisense" primer obsahoval XmaI místo (podtržené):

5' - AACTTCCCGGGTATCATTAGCTGC - 3' [SEQ ID NO 24]

Výsledky

pKTBi-Vβ 5.3

Paralelně s výše zmíněnou prací byl STII leader odstraněn z expresního plasmidu. Protože většina exprivovaného Vβ 5.3

je zadržována intracelulárně (také viz níže), bylo očekáváno, že rozsah tohoto konstruktů by mohl přinášet heterogení populaci V β 5.3 molekul, t.j. plus a minus leader, která by mohla komplikovat následnou purifikaci zpracovaného V β 5.3. Proto byl STII leader odstraněn za vzniku pKTBi-V β 5.3 pro intracelulární expresi. U exprivovaného V β 5.3 je očekáváno, že obsahuje N-terminální methionin, ačkoliv tato aminokyselina může být odstraněna endogeními methionin aminopeptidasami (Ben-Bassat et al., 1987, J. Bacteriology, 169:751-757, Baneyx and Georgiou, "Expression of Proteolytically Sensitive Polypeptides in Escherichia coli", ve Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A: Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation (Tim J. Ahern and Mark C. Manning, eds.), Plenum Press, New York, str. 69-108 (1992)), jak bylo pozorováno pro pKBi-V β 5.3 (níže).

pKTBi-V β 5.3 byl kompletován, ale selhal v expresi signifikantních hladin proteinu v E. coli LJ24 (viz. Tabulku 3, supra). Celý V β 5.3 insert byl sekvenován a determinován jako jednoznačně správný. Plasmidová DNA izolovaná po indukci a analyzovaná restrikční digescí se jevila nealterovanou. Jedno možné vysvětlení pro zjevné selhání LJ24 kmenu obsahujícího pKTBi-V β 5.3 pro expresi signifikantních hladin V β 5.3 proteinů je, že absence leader peptidu destabilisuje intracelulární V β 5.3 protein a vede k jeho rychlé proteolýze.

Proto byl pKTBi-V β 5.3 transformován do proteasa deficientních kmenů SG22094 (lon^+ , clp^+), a BL21 (lon^+ , $ompT^+$), které dávaly nižší výtěžek tak, aby SG22904 > BL21. Vliv různých indukčních teplot na výtěžek byl také zkoušen, a pro oba kmeny bylo 42 °C optimálních. Navíc zde nebylo signifikantní zvýšení produkce mezi 2 h a 5 h.

pKTBi-V β 5.3 byl exprivován ve dvou dalších proteasa deficientních kmenech: SG21163 (lon^+ , $htpr^+$) a SG21173 (lon^+ , $htpr^+$, clp^+). Výsledky jsou sumarizovány v Tabulce 3 (supra).

Mělo by být zmíněno, že kmeny LJ24, SG22094, SG21163 a SG21174 neprodukují endogenní lac represor, protože lac gen je deletován u všech těchto kmenů. Tak divoký typ lac represoru neinterferuje s termální indukcí trc promotoru. Předchozí příklady ukazují, že V β 5.3 konstrukty bez signálního peptidu mohou být snadno exprivovány v proteasa deficientních hostitelích, resultující tak v produkci signifikantního množství V β 5.3 proteinu.

Příklad 13

Konstrukce pKBi-V β 5.3

Tento plasmid je identický k pKTBi-V β 5.3 minus g_{10} element a mini-cistron (SEQ ID NO.28). Plasmid pKBi (6.43kb) byl tráven NcoI a SalI a 970 bp fragment byl purifikován z agarosy. pKTBi-V β 5.3 (6.75 kb) byl tráven NcoI a SalI a 5.68 kb fragment byl stejně purifikován a ligován na 970 bp fragment za vzniku plasmidu pKBi-V β 5.3 (6.64 kb).

Výsledky

Tento na leadery chudý V β 5.3 konstrukt minus dva regulační elementy byl úspěšně exprivován v proteasa deficientních kmenech, naše pozorování jsou shodná s těmi pro pKTBi-V β 5.3. pKBi-V β 5.3 byl exprivován ve dvou dalších proteasa deficientních kmenech : SG21163 (lon^+ , $htpr^+$) a SG21173 (lon^+ , $htpr^+$, clp^+). Výsledky jsou sumarizovány v Tabulce 3. pKBi-V β 5.3 důsledně produkoval více proteinu než

pKTBi-V β 5.3 ve všech testovaných kmenech (Tabulka 3). N-terminální sekvenování exprivovaného proteinu ukázalo, že prvních 17 aminokyselinových residuí odpovídá očekávané V β 5.3 sekvenci a terminální methioninový zbytek nebyl přítomen. Plasmid byl také demonstrován jako stabilní.

Rozsah předkládaného vynálezu není omezen specifickými provedeními zde popsanými. Samozřejmě, různé modifikace vynálezu k těm, které jsou zde popsány se stanou zjevnými odborníkům v oboru z předešlého popisu a připojených obrázků. Takové modifikace jsou uvažovány jako spadající do rozsahu připojených nároků. Různé publikace jsou inkorporovány referencemi v jejich plném znění.

náhradní list

Seznam sekvencí

(1) Obecná informace:

- (i) Přihlašovatel: T Cell Sciences, Inc
- (ii) Název vynálezu: Proteiny V regionu antigenního
receptoru T buněk a metody jejich
přípravy

(iii) Počet sekvencí: 29

(iv) Korespondenční adresa:

- (A) Adresa: T Cell Sciences, Inc.
- (B) Ulice: 115 Fourth Avenue
- (C) Město: Needham
- (D) Stát: Massachusetts
- (E) Země: Spojené státy americké
- (F) ZIP: 02194-2725

(v) Počítačově čtecí forma:

- (A) Typ media: disketa, 3,50 inch, paměť 1,44 Mb
- (B) Počítač: IBM PC kompatibilní
- (C) Pracovní systém: MS-DOS
- (Software: WordPerfect 6.0

(vi) Údaje o přihlášce:

- (A) Číslo přihlášky:
- (B) Datum podání:
- (C) Klasifikace:

(vii) Data prioritní přihlášky:

- (A) Číslo přihlášky: 08/181,492
- (B) Datum podání: 13. leden 1994

náhradní list

(viii) Zástupce/agent-informace:

- (A) Jméno: Yankwich Leon R
- (B) Číslo registrace: 30,237
- (C) Referenční/poř.číslo: TCS-203-PCT (94,664-A)

(ix) Telekomunikační informace:

- (A) Telefon: 617-345-9100
- (B)Telefax: 617-345-9111

(2) Informace o SEQ ID NO: 1:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 34 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

TATAATGACT AGTCGCTGCA GCCAACCGCG GCTG

34

(2) Informace o SEQ ID NO: 2:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 23 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

GTCCTAGAGT ACTGAGCGGA TAC

23

(2) Informace o SEQ ID NO: 3:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 91 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Retězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

GGCTCGAGCC TAGGCTGCAG CCCGGGGCGC GCGCGGCCGC AGGCCTTTAA

50

TTAAGAGCTC CGGACCGCAC AATGTGGGCG CGCCCTTAAG A

91

(2) Informace o SEQ ID NO: 4:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 97 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Retězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

(A) Jméno:

(B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

CTAGTCTTAA GGGCGCGCCC ACATTGTGCG GTCCGGAGCT CTTAATTAAA
GGCCTGCGGC CGCGCGCGCC CCGGGCTGCA GCCTAGGCTC GAGCCGC

50

97

(2) Informace o SEQ ID NO: 5:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 103 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jeden

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

(A) Jméno:

(B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

```
CTAGTAAATT CTATTTCAAG GAGACAGTCA TAATGAAATA CCTATTGCCT      50
ACGGCAGCCG CTGGATTGTT ATTACTCGCT GCCCAACCAG CCATGGCCGA      100
GCT >          103
```

(2) Informace o SEQ ID NO: 6:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 95 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jeden

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

(A) Jméno:

(B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

CGGCCATGGC TGGTTGGGCA GCGAGTAATA ACAATCCAGC GGCTGCCGTA	50
GGCAATAGGT ATTTATTAT GACTGTCTCC TTGAAATAGA ATTTA	95

(2) Informace o SEQ ID NO: 7:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 105 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Retězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 7:

CTAGTAAATT CTATTTCAAG GAGACAGTCA TAATGAAAA GAATATAGCA	50
TTCCTACTAG CTTCAATGTT CGTCTTCTCT ATTGCAACTA ACGCGTACGC	100
ACATT	105

(2) Informace o SEQ ID NO: 8:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 98 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 8:

GTGCGTACGC GTTAGTTGCA ATAGAGAAGA CGAACATTGA AGCTAGTAGG 50

AATGCTATAT TCTTTTTTCAT TATGACTGTC TCCTTGAAAT AGAATTTA 98

(2) Informace o SEQ ID NO: 9:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 89 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

(A) Jméno:

(B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 9:

CTAGTCCGGA ATTGGGCATC GATTAAC TTT ATTATTAAAA ATTAAAGAGG

50

TATATATTAA TGTATCGATT AAATAAGGAG GAATAAATA

89

(2) Informace o SEQ ID NO: 10:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 76 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jeden

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

(A) Jméno:

(B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 10:

CTCCTTATTT AATCGATACA TTAATATATA CCTCTTTAAT TTTTAATAAT

50

AAAGTTAATC GATGCCCAAT TCCGGA

76

(2) Informace o SEQ ID NO: 11:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 71 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Retězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 11:

```
ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCTGC  
CCAACCAGCC ATGGCCGAGC T          71
```

50

(2) Informace o SEQ ID NO: 12:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 76 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Retězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

(A) Jméno:

(B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 12:

CGGCCATGGC TGGTTGGGCA GCGAGTAATA ACAATCCAGC GGCTGCCGTA
GGCAATAGGT ATTCATTAT TTATTC

50

76

(2) Informace o SEQ ID NO: 13:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 73 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jeden

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

(A) Jméno:

(B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 13:

ATGAAAAAGA ATATAGCATT CCTACTAGCT TCAATGTTTCG TCTTCTCTAT
TGCAACTAAC GCGTACGCAC ATT

50

73

(2) Informace o SEQ ID NO: 14:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 79 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Retězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 14:

GTGCGTACGC GTTAGTTGCA ATAGAGAAGA CGAACATTGA AGCTAGTAGG
AATGCTATAT TCTTTTCAT TATTTATTC

50

79

(2) Informace o SEQ ID NO: 15:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 33 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 15:

TAATTAGCCA TGGCCGGCGT AACCCAATCT CCG

33

(2) Informace o SEQ ID NO: 16:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 21 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

(A) Jméno:

(B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 16:

CCAGTGCCAA GCTTGCATGC C 21

(2) Informace o SEQ ID NO: 17:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 34 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Řetězec: jeden

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

(A) Jméno:

(B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 17:

GAAATTAACG CGTACGCAGG CGTAACCCAA TCTC 34

(2) Informace o SEQ ID NO: 18:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 21 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 18:

CCAGTGCCAA GCTTGCATGC C 21

(2) Informace o SEQ ID NO: 19:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 110 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

(A) Jméno:

(B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 19:

```
CTAGTCCGGA ATTGGGCATC GATTAAC-TTT ATTATTAAAA ATTAAAGAGG
TATATATTAA TGTATCGATT AAATAAGGAG GAATAAACCA TGGCACATTG
TGCGGTCCGC          110
```

50

100

(2) Informace o SEQ ID NO: 20:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 110 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Retězec: jeden

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

(A) Jméno:

(B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 20:

```
CCGGGCGGAC CGCACAAATGT GCCATGGTTT ATTCCTCCTT ATTTAATCGA      50
TACATTAATA TATACCTCTT TAATTTTAA TAATAAAGTT AATCGATGCC      100
CAATTCCGGA              110
```

(2) Informace o SEQ ID NO: 21:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 42 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 21:

```
CTAGTAAATT ATATTTAAAG GAGGAATAAA CCATGGCACA TT      42
```

(2) Informace o SEQ ID NO: 22:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 35 párů bází

- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 22:

GTGCCATGGT TTATTCCTCC TTAAATATA ATTTA

35

(2) Informace o SEQ ID NO: 23:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 20 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 23:

TATAGTCCAT GGGCGTAACC

20

(2) Informace o SEQ ID NO: 24:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 25 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 24:

AACTTCCCGG GGTATCATTG GCTGC

25

(2) Informace o SEQ ID NO: 25:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 276 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 25:

GGC GTA ACC CAA TCT CCG ACT CAC CTG ATC AAA ACG AGA	39
GGA CAG CAC GTG ACT CTG AGA TGC TCT CCT ATC TCT GGG	78
CAC AAG AGT GTG TCC TGG TAC CAA CAG GTC CTG GGT CAG	117
GGG CCC CAG TTT ATC TTT CAG TAT TAT GAG AAA GAA GAG	156
AGA GGA AGA GGA AAC TTC CCT GAT CGA TTC TCA GCT CGC	195
CAG TTC CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG AAT GTG AAC GCC	234
TTG TTG CTG GGG GAC TCG GCC CTG TAT CTC TGT GCC AGC	273
AGC	276

(2) Informace o SEQ ID NO: 26:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 276 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Retězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 26:

CCG CAT TGG GTT AGA GGC TGA GTG GAC TAG TTT TGC TCT	39
CCT GTC GTG CAC TGA GAC TCT ACG AGA GGA TAG AGA CCC	78
GTG TTC TCA CAC AGG ACC ATG GTT GTC CAG GAC CCA GTC	117
CCC GGG GTC AAA TAG AAA GTC ATA ATA CTC TTT CTT CTC	156
TCT CCT TCT CCT TTG AAG GGA CTA GCT AAG AGT CGA GCG	195
GTC AAG GGA TTG ATA TCG AGA CTC GAC TTA CAC TTG CGG	234
AAC AAC GAC CCC CTG AGC CGG GAC ATA GAG ACA CGG TCG	273

(2) Informace o SEQ ID NO: 28:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 27 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

- (A) Jméno:
- (B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 28:

ATG TAT CGA TTA AAT AAG GAG GAA TAA 27

(2) Informace o SEQ ID NO: 29:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 8 párů bází
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Rys:

(A) Jméno:

(B) Lokace:

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 29:

Met Tyr Arg Leu Asn Lys Glu Glu
1 5 8

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob produkce kompletních rekombinantních proteinů
V regionu antigeního receptoru T buněk,

v y z n a ě u j í c í s e t í m, že zahrnuje

a) transformování kompetentních bakteriálních
hostitelských buněk rekombinantním expresním vektorem
obsahujícím region kodující kompletní protein

V regionu antigeního receptoru T buňky a indukovatelný
bakteriální promotor.

b) indukci indukovatelného bakteriálního promotoru v
tranformovaných bakteriálních buňkách kroku a), a

c) získání kompletního rekombinantního proteinu V
regionu antigeního receptoru T buňky prostého cizích
proteinových sekvencí.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a ě u j í c í s e t í m,
že indukovatelný bakteriální promotor je vybrán ze skupiny
sestávající z chemicky regulovaných promotorů a termálně
regulovaných promotorů.

3. Způsob podle nároku 2, v y z n a ě u j í c í s e t í m,
že expresní vektor dále obsahuje regulační genovou sekvenci
vybranou ze skupiny sestávající z lacI, lacI^q a lacI^{ts}
genu.

4. Způsob podle nároku 3, v y z n a ě u j í c í s e t í m,
lacI^{ts} gen je ve stejné orientaci jako kodující region T pro
proteiny V regionu antigeního receptoru T buněk.

5. Způsob podle nároku 1, v y z n a ě u j í c í s e t í m,
že bakteriální promotor je vybrán ze skupiny sestávající

07.10.97

z lac promotoru, tac promotoru a trc promotoru.

6. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že bakteriální hostitelský kmen je proteasa deficientní kmen.

7. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, rekombinantní expresní vektor dále zahrnuje leader sekvenci.

8. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že leader sekvence je vybrána ze skupiny sestávající z termostabilního enterotoxinu STII leaderu z *Escherichia coli* a pelB leaderu z *Erwinia carotovora*.

9. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rekombinantní expresní vektor dále zahrnuje leader sekvenci odvozenou od STII leader sekvence *E.coli* a kompetentní bakteriální hostitelskou buňkou je buňka, která nenesení lacI nebo lacI^q gen.

10. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že bakteriálním hostitelským kmenem je kmen proteasa deficientní.

11. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteasa deficientní kmen je selektován ze skupiny sestávající z SG21163 a SG21173.

12. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kde expresní vektor dále zahrnuje regulační elementy g10 a mini-cistronovou sekvenci (SEQ ID NO.28).

13. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rekombinantní expresní vektor dále zahrnuje :

- a) trc promotor jako indukovatelný bakteriální promotor
- b) ribosomové vazebné místo
- c) transkripční terminátor
- d) lacI_{ts} regulační genovou sekvencí
- e) pBR322 zdroj replikace
- f) gen tetracyklinové resistance.

14. Způsob podle nároku 13, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že rekombinantní expresní vektor je vybrán ze skupiny sestávající z pKTBi-Vβ 5.3, a pKBi-Vβ 5.3.

15. Způsob podle nároku 13, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že rekombinantní expresní vektor dále zahrnuje leader sekvenci.

16. Způsob podle nároku 15, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že rekombinantní expresní vektor je vybrán ze skupiny sestávající z pK-Vβ 5.3, pKT-Vβ 5.3, pKTB-Vβ 5.3, a pKB-Vβ 5.3.

17. Expresní vektor zahrnující indukovatelný bakteriální promotor pod kontrolou lacI_{ts} genu, kde řečený lacI_{ts} gen kontroluje expresi regionu kodujícího pro kompletní protein V regionu antigeního receptoru T buňky.

18. Expresní vektor nároku 17, kde indukovatelný bakteriální promotor je vybrán ze skupiny sestávající z lac promotoru, tac promotoru a trc promotoru.

19. Expresní vektor nároku 18, který dále zahrnuje leader sekvenci.

20. Expresní vektor, podle nároku 17, který zahrnuje v 5' - 3' směru:

07.10.97

- a) trc promotor
- b) ribosomové vazebné místo
- c) region kodující kompletní protein V regionu antigeního receptoru T buněk
- d) transkripční terminátor
- e) lacI_{ts} regulační genovou sekvenci
- f) pBR322 zdroj replikace a
- g) gen tetracyklinové resistance.

21. Expresní vektor podle nároku 17, kde uvedený vektor je vybrán ze skupiny, zahrnující pK-STII-V β 5.3, pKT-V β 5.3, pKTBi-V β 5.3, pKTBi-V β 5.3 a pKBi-V β 5.3.

22. Bakteriální buňka transformovaná expresním vektorem podle nároku 17.

23. Bakteriální buňka podle nároku 22, která produkuje alespoň 300 miligramů rekombinantního kompletního proteinu V β regionu antigeního receptoru T buněk na litr buněčné kultury.

24. Izolovaný kompletní protein V regionu antigeního receptoru T buněk produkovaný podle nároku 13.

25. Farmaceutická kompozice, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kompletní protein V regionu antigeního receptoru T buněk.

26. Farmaceutická kompozice nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteinem V regionu antigeního receptoru je V β 5.3 protein a má vzorec: aminokyseliny 1 až 92 aminokyselinové sekvence ID No.27.

27. Použití v podstatě čistého T buněčného antigeního

07.10.97

receptoru proteinu V regionu podle nároku 31, kde s imunitou spojenou chorobou je roztroušená sklerosa.

28. Použití v podstatě čistého T buněčného antigenního receptoru proteinu V regionu podle nároku 28, kde kompletním proteinem V regionu antigenního receptoru T buněk je V β 5.3 a má vzorec:
aminokyseliny 1 až 92 aminokyselinové sekvence ID No.27.

29. Izolovaný kompletní protein V β 5.3 antigenního receptoru T buněk mající vzorec: aminokyseliny 1 až 92 aminokyselinové sekvence ID No.27.

30. Použití v podstatě čistého proteinu V regionu antigenního receptoru T buněk pro výrobu léčiv pro léčbu imunitních chorob.

31. Izolovaný kompletní protein V regionu antigenního receptoru T buněk podle nároku 24 nebo 30 pro použití v terapii.

32. Izolovaný kompletní protein V regionu antigenního receptoru T buněk podle nároku 24 nebo 30 pro použití v diagnostice s imunitou spojených chorob.

33. Způsob diagnostiky imunitních chorob zahrnující užití kompletního rekombinantního proteinu V regionu antigenního receptoru T buněk k detekci přítomnosti jednotlivých subpopulací T buněk asociovaných s imunitními chorobami nebo přítomnost autoprotilátek rozpoznávajících jednotlivé proteiny V regionu v biologických vzorcích od pacientů.

2009-96

1/2

Obr. 1

1 GGC GTA ACC CAA TCT CCG ACT CAC CTG ATC AAA ACG AGA GGA CAG
 CCG CAT TGG GTT AGA GGC TGA CTG GAC TAG TTT TGC TCT CCT GTC
 1 Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys Thr Arg Gly Gln

46 CAC GTG ACT CTG AGA TGC TCT CCT ATC TCT GGG CAC AAG AGT GTG
 GTG CAC TGA GAC TCT ACG AGA GGA TAG AGA CCC GTG TTC TCA CAC
 16 His Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Ile Ser Gly His Lys Ser Val

91 TCC TGG TAC CAA CAG GTC CTG GGT CAG GGG CCC CAG TTT ATC TTT
 AGG ACC ATG GTT GTC CAG GAC CCA GTC CCC GGG GTC AAA TAG AAA
 31 Ser Trp Tyr Gln Gln Val Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe Ile Phe

136 CAG TAT TAT GAG AAA GAA GAG AGA GGA AGA GGA AAC TTC CCT GAT
 GTC ATA ATA CTC TTT CTT CTC TCT CCT TCT CCT TTG AAG GGA CTA
 46 Gln Tyr Tyr Glu Lys Glu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Phe Pro Asp

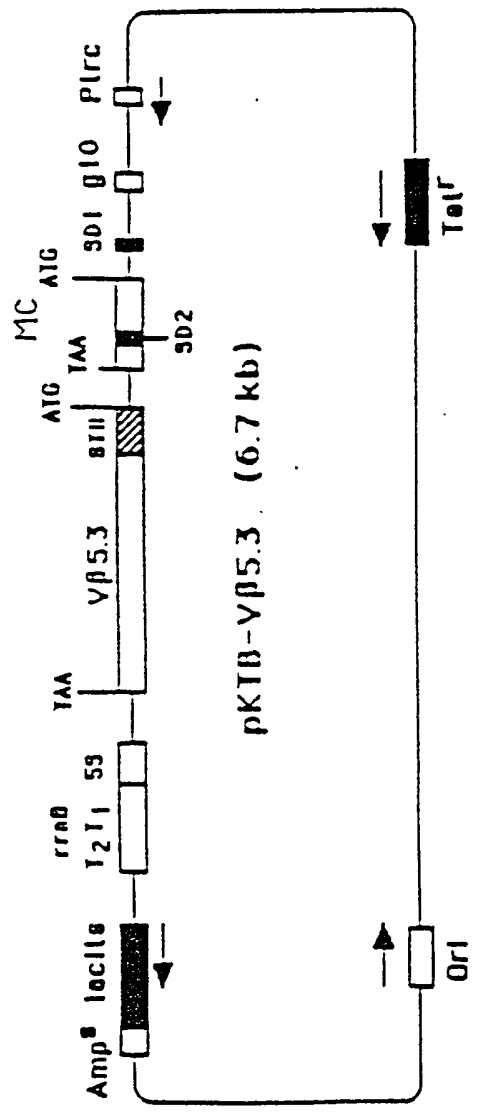
181 CGA TTC TCA GCT CGC CAG TTC CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG AAT
 GCT AAG AGT CGA GCG GTC AAG GGA TTG ATA TCG AGA CTC GAC TTA
 61 Arg Phe Ser Ala Arg Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn

226 GTG AAC GCC TTG TTG CTG GGG GAC TCG GCC CTG TAT CTC TGT GCC
 CAC TTG CGG AAC AAC GAC CCC CTG AGC CGG GAC ATA GAG ACA CGG
 76 Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala

271 AGC AGC [SEQ ID NO. 25]
 TCG TCG [SEQ ID NO. 26]
 91 Ser Ser [SEQ ID NO. 27]

PRŮMYSLOVÉHO
 VLASTNICTVÍ
 ÚRAD
 PŘÍL.
 21. XI. 96
 DOŠLO
 85263
 E.J.

Obr. 2



Pril.	URAD	21 XI 96	00510	185263	2.1.
VLASTNICTV	PRMYSLOVEHO				