

Transzgenikus úton előállított fúziós fehérjék

K I V O N A T

A találmány tárgya eljárás transzgenikus fúziós fehérje előállítására, amely során olyan transzgenikus állatot állítanak elő, amely tartalmazza a fúziós fehérje expresszióját biztosító transzgént; ezáltal lehetővé teszik a transzgen expresszióját, és a fúziós fehérjének a transzgenikus állat tejéből történő kinyerését. ^{A találmány tárgya továbbá} a találmány szerinti fúziós fehérje expresszióját biztosító nukleinsavkonstrukció, valamint gyógyászati vagy táplálék-kiegészítő készítmény, amely hatásos mennyiségű fúziós fehérjét tartalmaz, például az itt ismertetett immunglobulin-enzim-fúziósfehérjét és gyógyászatilag elfogadott hordozót.

A találmány alkalmazható diagnosztikában és humán gyógyászatban, például rendellenes vagy kóros, a felszínén célantigént expresszáló sejt, például sejtfelszíni antigént expresszáló ráksejt elpusztítására szolgáló eljárásban.

Jell. d'ora Ø
Zoltán Ádám

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

Transzgenikus úton előállított fúziós fehérjék

A találmány tárgyát képezik transzgenikus úton előállított fúziós fehérjék (pl. immunglobulin-enzim-fúziós-fehérjék), fúziós fehérjéket kódoló nukleinsavak, valamint fúziós fehérjék és nukleinsavak előállítására és alkalmazására szolgáló eljárások.

A találmány előnyösen alkalmazható diagnosztikában és humán gyógyászatban, például rendellenes vagy kóros, a felszínén célantigént expresszáló sejt, például sejtfelszíni antigént expresszáló ráksejt elpusztítására szolgáló eljárásban.

A kitanítás részét képezi a 60/101083. sz. ideiglenes USA-beli szabadalmi bejelentés, amelyet 1998. szeptember 18-én nyújtottunk be.

Növekvő számban fejlesztenek ki rekombináns fehérjét terápiás és diagnosztikai alkalmazások céljaira. E fehérjék esetében azonban sokszor hagyományos eljárásokkal bonyolult vagy költséges lehet funkcionális formában és/vagy a kívánt

menyiségben történő előállítás. Hagyományos eljárás többek között az adott fehérje termeléséért felelős gén beillesztése gazdasejtbe, például baktériumokba, élesztőbe vagy emlőseredetű sejtbe, például COS-sejtekbe, és ezután a sejtek tápközegben történő tenyésztése. A tenyésztett sejtek ezután a kívánt fehérjét szintetizálják. A hagyományos, baktériumokon vagy élesztőn alapuló rendszerek sok esetben alkalmatlanok lehetnek nagy mennyiségű, komplex fehérje funkcionális formában történő előállítására. Az emlőseredetű sejtek képesek komplex fehérjék reprodukálására, azonban tenyésztésük általában bonyolult és drága, és gyakran csak mg/l-es mennyiségű fehérjemennyiségeket termelnek. A baktérium-, élesztő- vagy emlőseredetű rendszerek alkalmazásainak korlátai különösen érvényesek komplex fehérjék esetében, mint például immunglobulin-enzim-fúziósfehérje esetében, amely megfelelő poszt-transztlációs módosításokat és funkcionális formává történő összekapcsolódást igényel.

Az alábbiakban röviden összefoglaljuk a találmányt.

Általában a találmány tárgyat képezi transzgenikus fúziós fehérje, például immunglobulin-enzim-fúziósfehérje szolgáló eljárás. Az eljárás magában foglalja transzgenikus állat, például olyan kecske vagy szarvasmarha előállítását, amely biztosítja a fúziós fehérje, például immunglobulin-enzim-fúziósfehérje expresszióját biztosító transzgént; a transzgén expresszióját lehetővé téve, és előnyösen a fúziós fehérje transzgenikus állat tejéből történő kinyerését. (A találmány előnyös megvalósítási módja szerint a talál-

mány tárgyát képezi tejben történő expresszió, azonban más promóterek, pl. más szövetspecifikus promóterek, pl. izom-, haj-, vizelet-, vér-, vagy tojásspecifikus promóterek szintén alkalmazhatóak fúziós fehérje más szövetekben vagy termékekben történő előállítására).

A találmány előnyös megvalósítási módja szerint a transzgen magában foglal egy első tagot, amely egy második taggal van fuzionáltatva. Az első tag tartalmazhatja célba juttató molekula alegységét, például Ig-alegységet, például tumorspecifikus antigénre (pl. karcinoembriotikus antigén, azaz CEA, transzferrinreceptor, TAG-72, epidermális növekedésifaktor-receptor) specifikus Ig-alegységet. A második tag lehet: enzim, Ig-alegységen, vagy fragmensén kívül más polipeptid, RN-áz, például RN-áz-A, például angiogenin, vagy karboxipeptidáz-B-enzim.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgenikus fúziós fehérjét a transzgenikus állat, például kérődző állat, például kecske vagy szarvasmarha emlőmirigyében állítjuk elő.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgenikus fúziós fehérje transzgenikus emlősállat, például kérődző, például tejelő állat, pl. kecske vagy szarvasmarha tejébe szekretálódik.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgenikus fúziós fehérje transzgenikus emlősállat tejébe legalább körülbelül 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml vagy nagyobb koncentrációban szekretálódik.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgenikus fúziós fehérjét emlőmirigy-specifikus promóter, például tejspecifikus promóter, pl. tejsavó-fehérje- vagy kazeinpromóter szabályozása alatt állítjuk elő. A tejspecifikus promóter lehet kazeinpromóter, béta-laktoglobulin-promóter, savas tejsavófehérje-promóter vagy laktalbumin-promóter. Előnyösen a promóter kecskeeredetű β -kazein-promóter.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a fehérje a következő képlettel írható le: R1-L-R2; R2-L-R1; R2-R1 vagy R1-R2, ahol R1 immunglobulin-molekularész, L peptidkapcsoló és R2 második tag, például enzim-molekularész. Előnyösen az R1 és az R2 kovalens módon vannak kapcsolva, például közvetlenül fuzionáltatva vagy peptidkapcsolóval kötve.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgenikus fúziós fehérje ráadásul tartalmaz:

szignálszekvenciát, amely a fúziós fehérje szekrécióját vezérli, például szekretálódó fehérjéből származó szignált (pl. tejbe szekretálódó fehérje szignálját; vagy immunglobulin szekréciós szignálját); és

-(adott esetben) szekretálódó fehérje, például tejbe szekretálódó fehérje, vagy immunglobulin amino-terminális részének ahhoz elegendő részét kódoló szekvenciáját, hogy elősegítse a fúziós fehérje szekrécióját, például a transzgenikus állat tejébe történő szekrécióját.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a fúziós fehérje tartalmaz monoklonális antitest-alegységet, például humán eredetű, rágcsálóeredetű (pl., egérieredetű) monoklonális antitest-alegységet, vagy részét, pl. antigénkötő-fragmensét. A monoklonális antitest-alegység vagy antigénkötő-fragmense lehet egyláncú polipeptid, nehézláncból és könnyűláncból álló dimer, vagy két nehézláncból és könnyűláncból álló tetramer. Előnyösen a monoklonális antitest humán eredetű antitest vagy fragmense, például antigénkötő-fragmense. Például a humán antitestet előállíthatjuk olyan hibridómával, amely tartalmaz nem humán eredetű, transzgenikus állati szervezetből, például transzgenikus egerből származó B-sejteket, amely genomja tartalmaz humán eredetű nehézlánc-transzsgént és könnyűlánc-transzsgént, és a B-sejteket immortalizált sejtekkel fuzionáltattunk. Az antitestek lehetnek különböző izotípusúak, többek között IgG (pl. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgA *sub.sec.*, IgD, IgE. Előnyösen az antitest IgG-izotípusú. Az antitestek lehetnek teljes hosszúságúak (pl. IgG1- vagy IgG4-antitest) vagy állhatnak csak antitestkötő részekből (pl. Fab, F(ab')₂, Fv vagy egyláncú Fv-fragmens)

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a fúziós fehérje immunglobulin-alegysége rekombináns antitest, például kiméra- vagy humanizált antitest; ezek alegysége vagy antigénkötő fragmense, például olyan variábilis régióval, vagy legalább komplementaritást meghatározó régióval (CDR) rendelkezik, amely nem humán antitestből száрма-

zik (pl. rágcsálóeredetű), és a további rész (részek) humán eredetűek.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a fúziós fehérje immunglobulin-alegysége monovalens (pl. tartalmaz egy pár nehéz- és könnyűláncot, vagy ezek antigénkötő-részét). A találmány más megvalósítási módjai szerint a fúziós fehérje bivalens antitest (pl. két pár nehézláncot és könnyűláncot tartalmaz, vagy ezek antigénkötő részeit).

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a fúziós fehérje magában foglal immunglobulin-nehézláncot vagy annak fragmensét, például antigénkötő fragmensét. Előnyösen az immunglobulin-nehézlánc vagy fragmense (pl. antigénkötő fragmense) enzimhez van kapcsolva peptidkapcsolóval vagy direkt módon fuzionáltatva. Előnyösen az immunglobulinnehézlánc-enzim-fúziósfehérje képes enzimaktivitással rendelkező funkcionális komplex, például dimer, trimer, tetramer vagy multimerkompleksszé való összeszerelődésre.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgenikus fúziós fehérje magában foglal immunglobulin-nehézláncot vagy annak fragmensét (például antigénkötő fragmensét), és -könnyűláncot vagy fragmensét (pl. antigénkötő fragmensét). Előnyösen az immunglobulin-nehézlánc enzimhez van kapcsolat peptidkapcsolóval vagy direkt módon fuzionáltatva. Előnyösen a fuzionált immunglobulinnehézlánc-enzim-fúziósfehérje képes összeszerelődni, például en-

zimaktivitással rendelkező funkcionális komplex, például dimer, trimer, tetramer vagy multimerkomplex kialakítására.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a fúziós fehérjében található enzim RN-áz, például RN-áz-A, például angiogenin, vagy karboxipeptidáz-B-enzim. Diagnosztikai alkalmazások céljaira az enzim lehet tormaeredetű peroxidáz.

A találmány előnyös megvalósítási módja szerint a fúziós peptid tartalmaz peptidkapcsolót, és a peptidkapcsoló rendelkezik a következő tulajdonságok közül eggyel vagy többel: a) lehetővé teszi az első és a második tag egymáshoz viszonyított rotációját; b) ellenálló a proteázokkal való emésztéssel szemben; c) nem lép kölcsönhatásba az immunoglobulinnal vagy az enzimmel; d) lehetővé teszi a fúziós fehérje komplexképzését (pl. dimer, trimer, tetramer vagy multimerkomplex), ahol a komplex megtartja enzimaktivitását; e) elősegíti a fúziós fehérje aktív komplexsé való hajtogatódását (*folding*) és/vagy összeszerelődését.

A találmány előnyös megvalósítási módja szerint a fúziós peptid tartalmaz peptidkapcsolót, és a peptidkapcsoló hossza 5-60, előnyösen 10-30 aminosav; egy előnyös megvalósítási mód szerint a peptidkapcsoló 20 aminosavból áll vagy a peptidkapcsoló 17 aminosavból áll; a peptidkapcsolót alkotó mindegyik aminosav lehet: Gly, Ser, Asn, Thr vagy Ala; a peptidkapcsolót tartalmaz Gly-Ser-elemet.

A találmány előnyös megvalósítási módja szerint a fúziós fehérje tartalmaz peptidkapcsolót, és a peptidkapcsoló tartalmaz a (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_y-képlettel leírható szek-

venciát, ahol y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 vagy 8. Előnyösen a peptidkapcsoló tartalmaz a (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)₃-képlettel leírható szekvenciát. Előnyösen a peptidkapcsoló tartalmaz a ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)₃-Ser-Pro)-képlettel leírható szekvenciát.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgenikus fúziós fehérje dimer-, trimer-, tetramer-, vagy nagyobb polimerizációs fokú komplexszé szerelődik össze.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgenikus fúziós fehérjét kódoló transzgén olyan nukleinsav-konstrukció, amely tartalmaz:

- a) adott esetben szigetelőszekvenciát („insulator”);
- b) promótert, például emlőhámuszövet-specifikus promótert, például tejfehérje-promótert;
- c) nukleotidszekvenciát, amely olyan, például tej-specifikus fehérjéből származó szignálszekvenciát kódol, amely alkalmas a fúziós fehérje szekréciójának vezérlésére;
- d) adott esetben nukleotid-szekvenciát, amely szekretálódó fehérje, például tejbe szekretálódó fehérje aminoterminális régiójának ahhoz elegendő részét kódolja, amely lehetővé teszi a nem szekretálódó fehérje szekrécióját, például transzgenikus emlősállat tejébe történő szekrécióját
- e) egy vagy több nukleotid-szekvenciát, amely fúziós fehérjét kódol, például az itt ismertetett immunglobulin-enzim-fúziósfehérjét kódolja; és

f) adott esetben emlősgén-eredetű, például emlőhám-szövet-specifikus gén (pl. tejfehérjégén) 3'-irányú nem transzlálódó régióját.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgén a-eleme (ha jelen van), b-, c-, d-elemei (ha jelen vannak), és az f-elem ugyanabból a génből származik; a transzgén a-eleme (ha jelen van), a b-, c-, d-elemei (ha jelen vannak), és az f-elem két vagy több génből származik. Például a szignálszekvencia, a promóter-szekvencia és a 3'-irányú nem transzlálódó szekvencia származhat emlőhám-szövet-specifikus génből, például tejsavófehérje génjéből vagy kazeingénből (pl. β -kazein-génből). Előnyösen a szignálszekvencia, a promóter-szekvencia és a 3'-irányú nem transzlálódó szekvencia kecskeeredetű β -kazein-génből származik.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgén promótere emlőhámszövet-specifikus promóter, például tejsavófehérje-promóter vagy kazeinpromóter (pl. β -kazein-promóter). A tejspecifikus promóter lehet kazeinpromóter, béta-laktoglobulin-promóter, savas tejsavófehérje-promóter, vagy laktalbumin-promóter. Előnyösen a promóter kecskeeredetű β -kazein-promóter.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgén által kódolt szignálszekvencia amino-terminális szekvencia, amely a fehérje expresszióját a sejten kívülre, vagy a sejtmembránba vezérli. Előnyösen a szignálszekvenciát olyan fehérjéből nyerjük, amely tejbe, például a transzgenikus állat tejébe szekretálódik.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgén 3'-irányú nem transzlálódó régiója magában foglal poli-adenilációs szignált, és azt emlőhámshözvet-specifikus génből, például tejsavófehérje-génből vagy kazeingénből nyerjük. A 3'-irányú nem transzlálódó régiót nyerhetjük kazeingénből (pl. β -kazein-génből), béta-laktoglobulin-génből, savas tejsavófehérje-génből vagy laktalbumin-génből. Előnyösen a 3'-irányú nem transzlálódó régiót kecskeeredetű β -kazein-génből nyerjük.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint az itt ismertetett transzgén a transzgenikus állat csírasejtjébe és/vagy szomatikus sejtjében integrálódik.

A találmány más szempontja szerint a találmány tárgyát képezi nukleinsav-konstrukció, előnyösen izolált nukleinsav-konstrukció amely tartalmaz:

- a) adott esetben szigetelőszekvenciát;
- b) promótert, például emlőhámshözvet-specifikus promótert, például tejfehérje-promótert;
- c) nukleotidszekvenciát, amely olyan, például tej-specifikus fehérjéből származó szignálszekvenciát kódol, amely alkalmas a fúziós fehérje szekréciónak vezérlésére;
- d) adott esetben nukleotidszekvenciát, amely szekretálódó fehérje, például tejbe szekretálódó fehérje aminoterminális kódoló régiójának ahhoz elegendő részét kódolja, amely lehetővé teszi nem szekretálódó fehérje szekréciónak, például transzgenikus emlőállat tejébe történő szekréciónak;

e) egy vagy több nukleotid-szekvenciát, amely az itt ismertetett fúziós fehérjét kódolja; és

f) adott esetben emlősgén-eredetű, például emlőhám-szövet-specifikus gén (pl. tejfehérjégen) 3'-irányú nem transzlálódó régióját.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a promóter emlőhám-szövet-specifikus promóter, például tejsavófehérje-promóter vagy kazeinpromóter (pl. β -kazein-promóter). A tejspecifikus promóter lehet kazeinpromóter, béta-laktoglobulin-promóter, savas tejsavófehérje-promóter, vagy laktalbumin-promóter. Előnyösen a promóter kecskeeredetű β -kazein-promóter.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a szignálszekvencia amino-terminális szekvencia, amely a fehérje expresszióját a sejten kívülre, vagy a sejtmembránba vezérli. Előnyösen a szignálszekvencia tejspecifikus fehérjéből származik. Előnyösen a szignálszekvencia a kódolt fúziós fehérje szekrécióját a transzgenikus állat, például transzgenikus emlősállat tejébe irányítja.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgén 3'-irányú nem transzlálódó régiója magában foglal poli-adenilációs szignált, és azt emlőhám-szövet-specifikus génből, például tejsavófehérje-génből vagy kazeingénből nyerjük. A 3'-irányú nem transzlálódó régiót nyerhetjük kazeingénből (pl. β -kazein-génből), béta-laktoglobulin-génből, savas tejsavófehérje-génből vagy laktalbumin-génből. Előnyösen a 3'-irányú nem transzlálódó régiót kecskeeredetű β -kazein-génből nyerjük.

A találmány más szempontja szerint a találmány tárgyát képezi gazdasejt, például izolált gazdasejt, amely magában foglalja a találmány szerinti nukleinsavat (pl. transzgént, pl. az itt ismertetett nukleinsav-konstrukciót).

A találmány más szempontja szerint a találmány tárgyát képezi gyógyászati készítmény vagy táplálék-kiegészítő, amely fúziós fehérje, például az itt ismertetett fúziós fehérje terápiásan hatásos mennyiségét tartalmazza, valamint tartalmaz gyógyászatilag elfogadott hordozót.

A találmány előnyös megvalósítási módja szerint a készítmény tartalmaz tejet.

A találmány más szempontja szerint a találmány tárgyát képezi transzgenikus állat, amely tartalmaz fúziós fehérjét kódoló transzgént, például az itt ismertetett immunoglobulin-enzim-fúziósfehérjét kódoló transzgént.

Előnyös transzgenikus állatok lehetnek többek között: emlősök; madarak; hüllők; erszényesek és kétéltűek. Alkalmas emlősök többek között: kérődzők; patások; házasított emlősállatok és tejelő állatok. Különösen előnyös állatok többek között: egér, kecske, juh, teve, nyúl, szarvasmarha, sertés, ló, ökör és láma. Alkalmas madarak többek között: csirke, liba és pulyka. Ha a transzgenikus fehérje a transzgenikus állat tejébe szekretálódik, akkor szükséges, hogy az állat alkalmas legyen legalább évente 1, előnyösen

legalább 10, vagy 100 liter tej termelésére. Előnyösen a transzgenikus állat kérődző, például kecske, szarvasmarha vagy juh. A legelőnyösebben a transzgenikus állat kecske.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgenikus állat csírasejtjei és szomatikus sejtjei tartalmazza a fúziós fehérjét kódoló transzgént, például az itt ismertetett fúziós fehérjét kódoló transzgént.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgenikus állatban expresszált fúziós fehérje emlőmirigy-specifikus promóter, például tejspecifikus promóter, például tejsavófehérje vagy kazein promótere szabályozása alatt expresszálódik. A tejspecifikus promóter lehet kazeinpromóter, béta-laktalbumin-promóter, savas tejsavófehérje-promóter, vagy laktalbumin-promóter. Előnyösen a promóter kecskeeredetű β -kazein-promóter.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a transzgenikus állat emlősállat, és az immunglobulin-enzim-fúziósfehérje a transzgenikus emlősállat tejébe legalább körülbelül 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml 5 mg/ml vagy nagyobb koncentrációban szekretálódik.

A találmány más szempontja szerint a találmány tárgyát képezi felszínén célantigént expresszáló, rendellenes vagy kóros sejt szelektív elpusztítására vagy lizálására szolgáló eljárás. Az eljárás magában foglalja:

a rendellenes vagy kóros sejtnak transzgenikusan előállított fúziós fehérje, például az itt ismertetett,

transzgenikusan előállított fúziós fehérjével való érintkeztetését, ahol a fúziós fehérje immunglobulin-tagja felismeri a célantigént.

A „peptidek”, „fehérjék” és „polipeptidek” kifejezéseket a leírásban felcserélhető módon alkalmazzuk.

Polipeptid vagy izolált polipeptid tisztított készítménye, alapvetően tiszta készítménye olyan polipeptidet jelent, amelyet elválasztottuk az azt expresszáló sejtben vagy szervezetben vele együtt előforduló legalább egy másik fehérjétől, lipidtől vagy nukleinsavtól, például a transzgenikus állatban vagy váladékában, például tejben vagy más, a transzgenikus állat által termelt anyagban, például tojásban található fehérjétől, lipidtől vagy nukleinsavtól. A polipeptidet előnyösen elválasztjuk az olyan anyagoktól, például antitestektől vagy gélmátrixtól, például poli-akrilamidtól, amelyeket tisztítására alkalmaztunk. A polipeptid a tisztított készítmény szárazanyag-tartalmának előnyösen legalább 10, 20, 50, 70, 80 vagy 95%-át alkotja. Előnyösen a készítmény tartalmaz fehérjeszekvenáláshoz elegendő polipeptidet; legalább 1, 10 vagy 100 µg polipeptidet; legalább 1, 10 vagy 100 mg polipeptidet.

Alapvetően tiszta nukleinsav az olyan nukleinsav, amely a következő feltételek egyikének vagy mindkettőnek eleget tesz: nem közvetlenül szomszédos azzal az egyik vagy akár mindkét szekvenciával, például kódoló szekvenciákkal, amelyekkel közvetlenül szomszédos a szervezet (amelyből a nukleinsav származik) természetes körülmények között előforduló genomjában (pl. az 5'-végen és a 3'-végen); vagy

amely alapvetően mentes olyan nukleinsav-szekvenciától, amelyekkel együtt fordul elő abban a szervezetben, amelyből a nukleinsav származik. A kifejezés magában foglal például rekombináns DNS-t, amely vektorba, például autonóm módon replikálódó plazmidba vagy vírusba, vagy prokarióta vagy eukarióta (szervezet) genomi DNS-be van beépítve, vagy amely más DNS-szekvenciáktól független, különálló molekula-ként létezik (pl. *PCR*-reakcióban vagy restrikciós endonukleázzal történő kezeléssel előállított cDNS vagy genomi DNS). Az „alapvetően tiszta DNS” kifejezés magában foglal olyan rekombináns DNS-t, amely további fúziósfehérjeszekvenciákat kódoló hibrid gén része.

A „transzgén” kifejezés alatt a leírásban olyan nukleinsav-szekvenciát (pl. egy vagy több fúziósfehérjepolipeptidet kódoló nukleinsav-szekvenciát) értünk, amelyet transzgenikus szervezet genomjába vittünk be. A transzgén tartalmazhat egy vagy több transzkripciószabályozó-szekvenciát és más nukleinsavat, mint például intronokat, amelyek szükségesek lehetnek a fúziós fehérjét kódoló nukleinsav optimális expressziójához és szekréciójához. A transzgén tartalmazhat erősítőszekvenciát („*enhancer*”). Fúziósfehérje-szekvencia lehet működőképesen kapcsolva olyan szövetspecifikus promóterrel, amely a fehérje transzgenikus állat tejébe történő szekretálódását eredményezi, például emlőhám-szövet-specifikus promóterrel, vizeletspecifikus promóterrel vagy tojásspecifikus promóterrel.

A „transzgenikus sejt” kifejezés alatt transzgént tartalmazó sejtet értünk.

A „transzgenikus szervezet” kifejezés alatt transzgenikus állatot vagy növényt értünk.

A „transzgenikus állat” kifejezésen nem humán jellegű állati szervezetet értünk, amelyben az állat sejtjei közül egy vagy több, és előnyösen alapvetően minden sejt tartalmaz emberi beavatkozás, mint például a technikában ismert transzgenikus eljárások által bevitt transzgént. A transzgént bejuttathatjuk a sejtbe direkt vagy indirekt módon a sejt prekursorába való bejuttatással, szándékos genetikai művelettel, mint például mikroinjekcióval vagy rekombináns vírussal történő fertőzéssel.

Az „emlős” kifejezés alatt olyan állatokat értünk, az embert kivéve, amelyek rendelkeznek emlőmiriggyel és tejet termelnek.

„Tejelő állat” alatt tejtermelő, rágcsálónál nagyobb, nem humán jellegű állatot értünk. A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a tejelő állat bőséges mennyiségű tejet termel és hosszú a tejelési időszaka, például lehet a szarvasmarha vagy kecske.

Az „alany” kifejezés alatt embert és állatot értünk. A leírásban a „nem humán jellegű állat” kifejezésen értünk gerinceseket, például emlősöket és nem emlősöket, mint például főemlősöket az emberen kívül, kérődzőket, madarakat, kételtűeket, hüllőket és rágcsálókat, például egereket és patkányokat. A kifejezés magában foglal nyulakat is.

A „transzgenikus növény” kifejezésen értünk olyan növényeket, előnyösen többsejtű vagy magasabb rendű növényeket, amelyekben a növény sejtjei egy vagy több, és előnyö-

sen alapvetően minden sejt tartalmaz emberi beavatkozás, mint például a technikában ismert transzgenikus eljárások által bevitt transzgént.

A „növény” kifejezésen értünk teljes növényt, növényi részt, növényi sejtet vagy növényi sejtek csoportját. A tálmány szerinti eljárásokban alkalmazható növények csoportja olyan tág, mint a transzformálásnak alávethető magasabb rendű növények osztálya, amely magában foglalja az egyszikűeket és a kétszikűeket is; magában foglal különböző ploiditási szintű növényeket, többek között poliploidokat, diploidokat és haploidokat.

A „táplálék-kiegészítő” kifejezésen olyan élelmiszeranyagot vagy a táplálék részét értjük, amely tartalmaz fúziós fehérjét. A táplálék-kiegészítők orvosi vagy egészségügyi értelemben előnyt nyújtanak, többek között rendellenesség megelőzését, kezelését vagy gyógyítását. A transzgenikus fehérje a táplálék-kiegészítőben gyakran legalább 100 µg/kg, előnyösebben legalább 1 mg/kg, a legelőnyösebben legalább 10 mg/kg koncentrációban vannak jelen. Táplálék-kiegészítő tartalmazhat transzgenikus állattól származó tejet.

Az „immunglobulin” és „antitest” kifejezések alatt olyan glikoproteineket értünk, amelyek tartalmaznak legalább két nehézláncot (H) és két könnyűláncot (L), amelyeket diszulfidhidak kapcsolnak össze. Minden nehézlánc nehézlánc-variábilisrégióból (rövidítése: HCRV vagy VH) és nehézlánc-konstansrégióból áll. A nehézlánc-konstansrégió három doménből áll: CH1, CH2 és CH3. Minden könnyűlánc

könnyűlánc-variábilisrégióból (rövidítése: LCRV vagy VL) és könnyűlánc-konstansrégióból áll. A könnyűlánc-konstansrégió egy doménből, a CL-ből áll. A VH- és a VL-régiók tovább oszthatók hipervariábilis régiókra, melyeket komplementaritást meghatározó régióknak nevezünk (CDR), amelyeket közé konzerváltabb, vázszerkezet-régióknak nevezett régiók (FR) ékelődnek. Minden VH és VL három CDR-ből és négy FR-ből áll, amelyek elrendeződése az N-terminális végtől a C-terminális végig: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. A nehézlánc és a könnyűlánc variábilis régiói tartalmazznak kötődomént, amely kölcsönhatásba lép antigénnel. Az antitestek konstans régiói közvetíthetik az immunglobulin gazdaszövetekhez vagy faktorokhoz, többek között az immunrendszer különböző sejtjeihez (pl. effektorsejtekhez) és a klasszikus komplement-rendszer első komponenséhez (C1q) való kötődését.

Az antitest „antigénkötő része” (vagy egyszerűen antitest része”) kifejezés alatt antitest egy vagy több olyan fragmensét értjük, amely megtartja az antigénhez (pl. célantigénhez) való specifikus kötődés tulajdonságát. Kimutatták, hogy antigén antigénkötő funkciója megvalósítható teljes hosszúságú antitest fragmenseivel. Az antitest „antigénkötő része” kifejezés által leírt kötőfragmensekre példák többek között 1) *Fab*-fragmens, amely VL-, VH-, CL- és CH1-doménekből felépülő monovalens fragmens; 2) *F(ab')₂*-fragmens, amely a csuklórégiójában diszulfidhíddal összekapcsolt két *Fab*-fragmenst tartalmazó bivalens fragmens; 3) a VH- és a CH1-doménekből álló *Fd*-fragmens; 4) antitest

egyik karja VL- és VH-doménjeiből álló Fv-fragmens; 5) VH-doménből dAb-fragmens [Ward és mtsai., Nature 341: 544-546 (1989)], és 6) izolált komplementaritást meghatározó régió (CDR). Ráadásul, noha az Fv-fragmens két doménjét, a VL- és a VH-régiót külön gének kódolják, ezek összekapcsolhatóak rekombináns eljárások alkalmazásával, szintetikus kapcsolóval, amely lehetővé teszi azt, hogy egy fehérjeként legyenek előállíthatóak, amely fehérjében a VL- és VH-régiók párt alkotnak monovalens molekulák kialakítására [egyláncú Fv-ként (scFv) ismert, lásd Bird és mtsai., Science 242: 423-426 (1988), és Huston és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988)]. Az ilyen egyláncú antitestek szintén az antitest „antigénkötő része” fogalmába értendők. Ezeket az antitestfragmenseket a szakember számára ismert hagyományos eljárásokkal állítják elő, és a fragmenseket alkalmazás céljára ugyanúgy szűrik (szkrínelik), mint az ép antitesteket.

A „monoklonális antitest” kifejezés alatt egyszerű („single”) molekuláris összetételű antitest-molekulát értünk. Monoklonális antitest-összeállítás („composition”) adott epitóra egyszeres („single”) kötési specifitást és affinitást mutat. Ennek megfelelően a „humán eredetű monoklonális antitest” kifejezés alatt egyszeres kötési specifitást és affinitást mutató antitesteket értünk, amelyek humán csírasejtből származó immunglobulin-szekvenciákból származó variábilis és konstans régiókkal rendelkeznek. A találmány egyik megvalósítási módja szerint a humán eredetű monoklonális antitesteket olyan hibridómával

állítjuk elő, amely olyan transzgenikus, nem humán jellegű állatból, például transzgenikus egérből származó B-sejteket tartalmaz, amely humán eredetű nehézlánc-transzgént és könnyűlánc-transzgént tartalmaz, immortalizált sejttel fuzionáltatva.

A „rekombináns humán antitest” kifejezés alatt értünk minden, rekombináns módon előállított, expresszált, emberi tevékenység által létrehozott, vagy humán eredetű immunglobulin-génre nézve transzgén állatból (pl. egérből) izolált humán eredetű antitestet; gazdasejtbe transzfektált rekombináns vektor alkalmazásával expresszált antitesteket; rekombináns, kombinatorikus humán eredetű antitestkönyvtárból izolált antitesteket, vagy olyan antitesteket, amelyeket bármely más módon, humán immunglobulin-génszekvenciák más DNS-szekvenciákhoz történő illesztését tartalmazó eljárásban állítottak elő, hoztak létre vagy izoláltak. Az ilyen rekombináns, humán eredetű antitestek humán csírasejtből származó variábilis és konstans régiókkal rendelkeznek. A találmány bizonyos megvalósítási módjai szerint azonban az ilyen rekombináns humán antitesteket *in vitro* mutagenézisnek (vagy humán eredetű Ig-szekvenciákra transzgén állat alkalmazása esetében *in vivo* szomatikus mutagenézisnek) vetjük alá, és így a rekombináns antitestek VH- és VL-régiói aminosav-szekvenciái olyan szekvenciák, amelyek nem létezhetnek *in vivo* a humán csíravonal antitest-készletében, noha humán eredetű VH- és VL-szekvenciákból származnak, és azzal rokonságot mutatnak.

Nukleinsav „működőképesen van kapcsolva”, ha más nukleinsav-szekvenciákkal funkcionális kapcsolatban van. Például promóter vagy erősítő („enhancer”) működőképesen van kapcsolva kódoló szekvenciával, ha hatást gyakorol a szekvencia transzkripciójára. A transzkripciós szabályozó szekvenciák esetében a „működőképesen kapcsolva” kifejezés azt jelenti, hogy a DNS-szekvenciák kapcsoltak és szomszédosak, és ahol két fehérje kódoló régiójának összekapcsolása szükséges, szomszédosak és azonos leolvasási keretben vannak.

A „vektor” vagy „konstrukció” kifejezés alatt olyan nukleinsav-molekulát értünk, amely alkalmas más, hozzá kapcsolt nukleinsav átvitelére. A vektor egy típusa a „plazmid”, amely cirkuláris, kettős láncú DNS-hurok, amelybe további DNS-szegmenseket illeszthetünk ligálási reakcióval. A vektor másik típusa virális vektor, amelybe további DNS-szegmenseket ligálhatunk a vírusgenomba. Bizonyos vektorok képesek a gazdasejtben autonóm replikálódásra, amelybe bejuttatták ezeket (pl. bakteriális replikációs kiindulóponttal rendelkező bakteriális vektorok és episzómális emlősvektorok). Más vektorok (pl. nem episzómális emlősvektorok) integrálódhatnak gazdasejt genomjában a gazdasejtbe történő bejuttatásuk során, és ezáltal a gazdasejttel együtt replikálódnak. Ráadásul bizonyos vektorok alkalmasak a velük működőképesen kapcsolt gének expressziója vezérlésére. Az ilyen vektorokat „rekombináns expressziós vektoroknak” (vagy egyszerűen „expressziós vektoroknak”) nevezzük. Általánosságban a rekombináns DNS-technológiákban gyakran alkalmazott expressziós vektorok plazmidok. A le-

írásban a „plazmid” és „vektor” kifejezéseket felcserélhető módon alkalmazhatjuk, mivel a legáltalánosabban alkalmazott vektorforma a plazmid. A találmány szerinti megoldásban alkalmazhatóak azonban az expressziós vektorok más, ilyen formái is, mint a virális vektorok (pl. replikációs képességükben hiányos retrovírusok, adenovírusok és adeno-asszociált vektorok).

A „rekombináns gazdasejt” („vagy egyszerűen „gazdasejt”) kifejezésen olyan sejtet értünk, amelybe rekombináns expressziós vektort vittünk be. Magától értetődik, hogy az ilyen kifejezéseken nem csak a konkrét célsejtet értjük, hanem az ilyen sejtek leszármazottjait is. Mivel mutációk miatt vagy akár környezeti hatások miatt a következő generációkban bizonyos mutációk felléphetnek, lehetséges, hogy az ilyen leszármazott az őssejttel ténylegesen nem azonos, azonban akkor is a „gazdasejt” kifejezés vonatkozik rájuk.

A találmány más jellegzetességei és előnyei az itt következő részletes leírás és az igénypontok alapján nyilvánvalóak.

Az alábbiakban a találmány részletes leírását adjuk meg.

Először röviden ismertetjük az ábrákat.

Az 1. ábra a genetikai antitest és antitest-angiogenin-fúziósfehérje vázlatos bemutatása.

A 2A. ábra a transferrinreceptor-antitest (E6) és az angiogenin-enzim-fúzió (CH2Ang) szerkezetének vázlatos ábrája. A következő DNS-eket fuzionáltattuk módosított, kecs-

keeredetű β -kazein-gén 2. és 7. exonja közé [DiTullio és mtsai., 1992] egér emlőmirigyében történő expresszió céljából: humán eredetű transzferinreceptor-elleni monoklonális antitest nehézlánca, E6 (1); ugyanaz a nehézlánc, CH2-doménjánál angiogenint (Ang) kódoló gén 5'-végéhez fuzionáltatva a korábban leírtak szerint [Rybak és mtsai., 1992] (2); az E6-antitest könnyűlánc (III). Üres kockák: nehézlánc; keresztben vonalkázott kockák: könnyűlánc; csíkos kockák: Ang.

A 2B. ábra az E6-IgG-antitesteket vagy a CH2-fúziós fehérjét termelő nőstényektől gyűjtött tej Western-analízisét mutatja be, amely redukált körülmények között készült, és az angiogenin-elleni vagy IgG-antitestek ellen hívtuk elő. A géltre 15 μ l, PBS-sel hígított tejet vittünk fel.

A 2C. ábra tisztított E6-antitest vagy CH2Ang Western-analízisét mutatja be. A blotokat a jelzett antitesetekkel vizsgáltuk; 1. sáv: 0.3 μ g E6; 3. sáv: 4 μ g E6; 4. és 5. sáv: 0.2 μ g CH2Ang.

A 3. ábra angiogenin vagy angiogenin-antitest-fúziós-fehérje (CH2Ang) mRNS-transzlációra gyakorolt hatását mutatja be. Az angiogenint vagy a fúziós fehérjét BMV-RNS-t és [35 S]-metionint tartalmazó lizátumhoz adtuk. A fehérjeszintézist úgy határoztuk meg, hogy az újonnan szintetizált fehérjébe a jelölt anyag beépülését vizsgáltuk, a leírtak szerint [Newton és mtsai., 1996]. 2-3-kísérletből származó adatokat gyűjtöttünk össze, és ábráztuk (adatok $\pm$ SEM). Az eredményeket vakpróbával (kontrollként szolgáló, nem

génkezelt próba, „mock”) való kezeléssel végzett kontrollreakció százalékos értékében fejeztük ki. Az IC_{50} -érték az Ang vagy az Ang-fúziósfehérje olyan koncentrációja, amely a fehérjeszintézis 50%-os gátlásához szükséges, és ezeket a dózis-hatás-görbékéből határoztuk meg. Telt körök: Ang, üres körök: CH2-Ang.

A 4. ábra az angiogenin-antitest-fúziósfehérje tenyésztett sejtekre gyakorolt citotoxikus hatását bemutató dózis-hatás-görbe. A CH2Ang SF539- és MDA-MB-231]^{mdr}-sejtekre gyakorolt *in vivo* toxicitását mutatja be, amelyet a fehérjeszintézis-gátlás alapján becsültünk meg. A citotoxikus mérési eljárásokat úgy határoztuk meg, hogy a [¹⁴C]-leucin fehérjékbe történő beépülését mértük, a Módszereknél leírtak szerint. A mérési eljárásokat szérum jelenlétében hajtottuk végre, és azt leucin- és szérummentes tápközegre cseréltük, mielőtt [¹⁴C]-leucinnal pulzusszerű kezelésnek vetettük alá. Az IC_{50} -érték Ang-fúziósfehérje olyan koncentrációja, amely 3 nap elteltével a fehérjeszintáz 50%-os gátlásához szükséges, és ezt közvetlenül a dóziszválasz-görbék alapján határoztuk meg. A SEM-et akkor ábrázoltuk, amikor értéke a jelnél nagyobb volt. Telt körök: SF539-es humán eredetű gliómasejtek; üres körök: humán eredetű MDA-MB-231]^{mdr1}-es emlőráksejtek.

A találmány tárgyát képezi, legalábbis részben, transzgenikus úton előállított fúziós fehérje. A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a fúziós fehérje tartalmaz immunglobulin-alegységet (pl. immunglobulin nehéz- vagy könnyűláncát), toxinnal (pl. enzimalegységgel) fuzio-

náltatva. Az itt ismertetett immunglobulin-enzim-fúziós-fehérje arra szolgál, hogy citotoxikus hatóanyagot (pl. az enzimet) nemkívánatos sejthez, például tumorsejthez juttassuk célba. Például az alábbi Példáknál leírt fúziós fehérjék (azaz enzimmel, pl. RN-áz-A-vagy karboxipeptidázzal fusionált, karcinoembriotikus antigén, CEA) alkalmazhatóak tumorsejthez történő célba juttatásra. Miután elegendő időt biztosítottunk arra, hogy az immunglobulin-enzim-fúziós-fehérje a tumoros helyen lokalizálódjon, nem toxikus prodrogot adhatunk be. Ez a prodrog a tumoros helyen lokalizálódott, célba juttatott enzim hatására erősen citotoxikus droggá alakul át, ami lehetővé teszi a drog terápiás szintjének elérését a beteg számára elfogadhatatlan toxicitás nélkül.

Immunglobulinok előállítása

Sejten található célantigén, például sejtfelszíni fehérje (pl. receptor) elleni monoklonális antitest előállítható eljárások széles választékával, többek között hagyományos monoklonális antitest-metodikával, például Kohler és Milstein standard szomatikus sejthibridizációs technikájával [Kohler és Milstein, Nature 256: 496 (1975)]. Előnyösek a szomatikus sejthibridizációs eljárások, azonban általában alkalmazhatóak más, monoklonális antitest előállítására szolgáló eljárások, például a B-limfociták virális vagy onkogén transzformációja.

Hibridómák előállítására szolgáló előnyös, állati eredetű rendszer az egéredetű rendszer. Az egérben történő hibridómatermelés nagyon jól megalapozott eljárás. Immunizálási előiratok és fúziós célokra immunizált

nizálási előiratok és fúziós célokra immunizált splenociták izolálására szolgáló eljárások jól ismertek a technikában. Fúziós partnerek (pl. egérmielóma-sejtek) és fúziós eljárások szintén ismertek.

Humán eredetű fehérjék elleni humán monoklonális antitestek (mAb-k) létrehozhatóak az egér (immun-) rendszere helyett a teljes humán immunrendszert hordozó transzgenikus egerek alkalmazásával. A konkrét antigénnel immunizált transzgenikus egerből származó splenocitákat alkalmazzuk humán fehérje epitópjaira specifikus affinitással rendelkező humán mAB-kat szekretáló hibridómák előállításához [lásd pl. Wood és mtsai., WO 91/00906. sz. nemzetközi szabadalmi bejelentés; Kucherlapati és mtsai., WO 91/10741. sz. nemzetközi közzétételi irat; Lonberg és mtsai., WO 92/03918. sz. nemzetközi szabadalmi bejelentés; Kay és mtsai., 92/03917. sz. nemzetközi szabadalmi bejelentés; Lonberg és mtsai., Nature 368: 856-859 (1994); Green, L.L. és mtsai., Nature Genet. 7: 13-21 (1994); Morisson, S.L. és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1994); Bruggeman és mtsai., Year Immunol. 7: 33-40 (1993); Tuailon és mtsai., PNAS 90: 3720-3724 (1993); Bruggeman és mtsai., Eur. J. Immunol. 21: 1323-1326].

Monoklonális antitestek előállíthatóak a rekombináns DNS-technológiában jártas szakember számára ismert más eljárásokkal is. A „kombinatorikus antitest-bemutató” („display”) néven ismert alternatív eljárást fejlesztettek ki adott antigén-specifitással rendelkező antitest-fragmensek azonosítására és izolálására, és ez alkalmazható

monoklonális antitestek előállítására [a kombinatorikus antitest-bemutatás leírását lásd a következő közleményekben: Sastry és mtsai., PNAS 86: 5728 (1989); Huse és mtsai., Science 246: 1275 (1989); Orlandi és mtsai., PNAS 86: 3833 (1989)]. A fent leírtak szerint állat immunogénnel történő immunizálása után az eredményül kapott B-sejt-készlet („pool”) antitest-repertoárját klónozzuk. Általánosságban ismertek az immunglobulin-molekulák változatos populációjának variábilis régiója DNS-szekvenciájának oligomer láncindítók és PCR alkalmazásával történő előállítására szolgáló eljárások. Például az 5'-irányú leader-szekvenciákhoz (szignálpeptidekhez) és/vagy az 1. vázszekvenciákhoz (FR1) tartozó kevert oligonukleotid-láncindítók, valamint a konzervált 3'-irányú konstans régió láncindítója alkalmazható számos egérereredetű antitest nehézlánca és könnyűlánca variábilis régiói PCR-amplifikálása céljából [Larrick és mtsai., Biotechniques 11: 152-156 (1991)]. Hasonló stratégia alkalmazható humán eredetű antitestek nehézlánca és könnyűlánca variábilis régiói amplifikálása céljából [Larrick és mtsai., Methods: Companion to Methods in Enzymology 2: 106-110 (1991)].

A találmány egy illusztrálásként szolgáló megvalósítási módja szerint RNS-t izolálunk B-limfocitákból, például perifériás vérsejtekből, csontvelőből vagy lép-preparátumokból standard előíratok alkalmazásával [lásd például a 4683202. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratot, Orlandi és mtsai., PNAS 86: 5728-5732 (1989), és Huse és mtsai., Science 246: 1275-1281 (1989)]. Az első

cDNS-láncot a nehézlánc (nehézláncok) és a κ - és a λ -könnyűláncok konstans régiójára specifikus láncindítók, valamint a szignálszekvencia láncindítója alkalmazásával szintetizáljuk. Variábilisrégió PCR-láncindítót alkalmazva mindkét nehézlánc és könnyűlánc variábilis régióit amplifikáljuk, mindegyiket önmagában vagy kombinációban, és a bemutatási („display”) „csomagok” előállításában további műveletek céljára alkalmas vektorokba ligáljuk. Az amplifikálási előiratokban alkalmazható oligonukleotid-láncindítók lehetnek unikálisak („unique”) vagy degeneráltak, vagy a degenerált pozíciókban beépítve tartalmazhatnak inozitot. A láncindítókba beépíthetünk restriktációs endonukleázok számára felismerési szekvenciákat, annak lehetővé tételére, hogy az amplifikált fragmenst expresszió céljából előre meghatározott leolvasási keretben vektorba klónozzuk.

Az immunizálásból származó antitest-repertoárból klónozott V-gén-könyvtár expresszálható antitest-bemutatási könyvtár létrehozása céljából bemutatási csomagok populációjának alkalmazásával, amelyek előnyösen filamentózus fágból származnak. Ideális esetben a bemutatási csomag tartalmaz olyan rendszert, amely lehetővé teszi nagyon nagy, változatos antitest-bemutatási könyvtárakból való mintavételt, minden affinitási elválasztási kör után gyors osztályozást, és a tisztított bemutatási csomagokból az antitestgén könnyű izolálását. A bemutatási fágkönyvtárak előállítására szolgáló, kereskedelmi forgalomban kapható reagenskészleteken kívül (pl. a *Pharmacia Recombinant Phage*

Antibody System nevű terméke, 27-9400-01. katalógusszámmal, és a *Stratagene SurfZAP™* fág-display reagenskészlete 240612. katalógusszámmal) változatos antitest-bemutatói könyvtár előállításában különösen jól alkalmazható eljárásokra és reagensekre példaként említhetjük a következőket: Ladner és mtsai., 5223409. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat; Kang és mtsai., 92/18619. sz. nemzetközi közzétételi irat; Dower és mtsai., WO 91/17271. sz. nemzetközi közzétételi irat; Markland és mtsai., WO 92/15679. sz. nemzetközi közzétételi irat; Breitling és mtsai., WO 93/01288. sz. nemzetközi közzétételi irat; McCafferty és mtsai., WO 92/01047. sz. nemzetközi közzétételi irat; Garrard és mtsai., WO 92/09690. sz. nemzetközi közzétételi irat; Ladner és mtsai., WO 90/02809. sz. nemzetközi közzétételi irat; Fuchs és mtsai., *Bio/Technology* 9: 1370-1372 (1991); Hay és mtsai., *Hum Antibod Hybridomas* 3: 81-85 (1992); Huse és mtsai., *Science* 246: 1275-1281 (1989); Griffiths és mtsai., *EMBO J* 12: 725-734 (1993); Hawkins és mtsai., *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992); Clackson és mtsai., *Nature* 352: 624-628 (1991); Garrard és mtsai., *Bio/Technology* 9: 1373-1377 (1991); Hoogenboom és mtsai., *Nuc Acid Res* 19: 4133-4137 (1991), és Barbas és mtsai., *PNAS* 88: 7978-7982 (1991).

A találmány bizonyos megvalósítási módjai szerint nehézlánc és könnyűlánc V-régió-doménjai expresszálnak ugyanazon a polipeptiden, flexibilis kapcsolóval kapcsolva egyláncú Fv-fragmens kialakításával, és az scFV-gént ezután a kívánt expressziós vektorba vagy fággenomba klónozva.

Amint az általánosságban le van írva McCafferty és munkatársai közleményében [McCafferty és mtsai., Nature 348: 552-554 (1990)], antitestek teljes, flexibilis (Gly₄-Ser)₃-kapcsolóval kapcsolt V_H- és V_L-doménjai alkalmazhatóak olyan egyláncú antitest előállításában, amely a bemutatási csomagot antigén-affinitási alapon elválaszthatóvá teszi. Az antigénnel immunreaktivitást mutató izolált scFV-antitestek ezt követően a találmány tárgyát képező eljárásban alkalmazható gyógyászati készítményben formulázható.

A „bemutatási csomag” („display package”) felszínén megjelenített antitest-könyvtárt a célantigénnel vagy peptidfragmenseivel szkrínelik, a célantigénhez specifikussal rendelkező antitestet expresszáló „csomagok” azonosítása és izolálása céljából. A kiválasztott antitestet kódoló nukleinsav a bemutatási csomagból (pl. a fág-genomból) kinyerhető és standard rekombináns DNS-eljárásokkal más expressziós vektorokba szubklónozható.

Felszíni fehérjéhez nagy affinitást mutató specifikus antitest-molekulákat állíthatunk elő a technikában ismert eljárásoknak megfelelően, többek között könyvtárak szkrínelésével [Ladner, R.C. és mtsai., 5233409. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat, Ladner, R.C. és mtsai., 5403484. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat]. Ráadásul az ilyen könyvtárakat alkalmazó eljárások alkalmazhatóak olyan kötődeterminánsok keresését szolgáló szkrínelésekben, amelyek antitestek szerkezeti determinánsainak mimetikumai.

Közelebbről adott antitest Fv-kötőfelszíne kölcsönhatásba lép a célligandumával a fehérje-fehérje kölcsönhatások elvei szerint, ezáltal a V_H és V_L (az utóbbi lehet κ - vagy λ -lánc típusú) szekvenciaadatai a szakember számára ismert fehérjekonstrukció („*protein engineering*”) technikák alapjai lehetnek. A kötődeterminánsokat tartalmazó fehérjefelszín részletes adatait antitest-szekvencia információkból nyerhetjük, más antitestek NMR-vizsgálataiból vagy krisztallográfiai adatokból nyert, korábban meghatározott háromdimenziós szerkezeteit alkalmazó modellezési eljárással. [lásd pl. Bajorath, J. és Sheriff, S., *Proteins: Struct., Funct. and Genet.* 24(2): 152-157 (1996); Webster, D.M. és Rees, A.R., „Molecular modelling of antibody-combining sites”, *Methods in Molecular Biol.* 51, *Antibody Engineering Protocols*, 17-49, szerk.: Paul, S., kiad: Human Press, Totowa, NJ], és Johnson, G., Wu, T.T. és Kabat, E.A., „Seqhunt: A program to screen aligned nucleotide and amino acids sequences”, *Methods in Molecular Biol.* 51: id. mű 1-15 (1995)].

A találmány egyik megvalósítási módja szerint változatos peptidkönyvtárt expresszálunk megjelenítési csomagok populációjával bemutatási peptidkönyvtár („*peptide display library*”) kialakítása céljából. Ideális esetben a bemutatási csomag tartalmaz olyan rendszert, amely lehetővé teszi nagyon nagy, változatos bemutatási peptidkönyvtárakból való mintavételt, minden affinitási elválasztási kör után gyors osztályozást, és a tisztított bemutatási csomagokból az antitestet kódoló gén könnyű izolálását. A bemutatási

peptidkönyvtárak lehetnek olyan prokarióta eredetű szervezetben és vírusokban, amelyek gyorsan amplifikálhatóak, és viszonylag könnyű azokkal műveleteket végrehajtani (manipulálni), és amely lehetővé teszi nagyszámú klón előállítását. Az előnyös bemutatási csomagok tartalmazznak például vegetatív baktériumsejteket, baktériumspórákat és legelőnyösebben bakteriális vírusokat (különösen DNS-vírusokat). A találmány tárgyát képezi azonban eukarióta eredetű sejtek, többek között élesztő és spórái potenciális bemutatási csomagként való alkalmazása is. A bemutatási fágkönyvtárak leírása megtalálható fent.

Más technika többek között az alkalmas „receptorral”, például célantigénnel való affinitási kromatográfia, amelyet az izolált kötőanyagok vagy ligandumok hagyományos technikákkal (pl. tömegspektrometriával és NMR-rel) történő azonosítása követ. Előnyösen az oldható receptor olyan jelöléssel (pl. fluorofórokkal, kolorimetriás enzimekkel, radioizotópokkal vagy lumineszcens vegyületekkel) van konjugálva, amely detektálható a ligandkötés jelzése céljából. Alternatív módon immobilizált vegyületek szabadulhatnak fel szelektív módon, és lehetővé tehetjük membránon keresztül történő diffundálásukat receptorral történő kölcsönhatásuk céljából.

Kombinatorikus vegyületkönyvtárak szintetizálhatóak a könyvtár mindegyik elemének azonosítására szolgáló toldalékkal („tag”) is [lásd W.C. Still és mtsai., WO 94/08051. sz. nemzetközi szabadalmi bejelentés]. Általánosságban az eljárásra jellemző az olyan inert, de könnyen detektálható

toldalékok alkalmazása, amelyek a szilárd hordozóhoz vagy a vegyületekhez vannak kapcsolva. Ha aktív vegyületet detektálunk, a vegyület azonosítását az egyedi kísérotoldalék azonosítása határozza meg. Ez a toldalékillesztési („tagging”) eljárás lehetővé teszi nagy vegyületkönyvtárak szintézisét, ahol a vegyületek a könyvtár teljes vegyületkészlete jelenlétében, nagyon alacsony szinteken azonosíthatóak.

A módosított antitest kifejezés magában foglal olyan antitesteket is, például monoklonális antitesteket, kiméraantitesteket és humanizált antitesteket, amelyek módosítva vannak például az antitest részeinek deletálásával, hozzáadásával vagy helyettesítésével. Antitest módosítható például a csuklórégió deletálásával, ezáltal monovalens antitestet előállítva. Minden módosítás a találmány oltalmi körébe tartozik mindaddig, amíg az antitest legalább egy specifikus antigénkötő-régióval rendelkezik.

Monoklonális, kiméra egér-humán antitestek (azaz kiméraantitestek) előállíthatóak a technikában állása szerint ismert rekombináns DNS-technikákkal. Például egérreredetű (vagy más fajból származó) monoklonális antitestmolekula Fc-konstans régióját kódoló gént restrikciós enzimekkel emésztjük az egérreredetű Fc-t kódoló régió eltávolítása céljából, és humán eredetű Fc-konstans régiót kódoló gén egyenértékű részével helyettesítjük [lásd Robinson és mtsai., PCT/US86/02269. sz. nemzetközi szabadalmi bejelentés; Akira és mtsai., 184187. sz. európai szabadalmi bejelentés; Taniguchi, M., 171496. sz. európai szabadalmi beje-

lentés; Morrison és mtsai., 173494. sz. európai szabadalmi bejelentés; Neuberger és mtsai., WO 86/01533. sz. nemzetközi szabadalmi bejelentés; Cabilly és mtsai., 48165567. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat; Cabilly és mtsai., 125023. sz. európai szabadalmi bejelentés; Better és mtsai., Science 240: 1041-1043 (1988); Liu és mtsai., PNAS 84: 3439-3443 (1987); Liu és mtsai., J. Immunol. 139: 3521-3526 (1987); Sun és mtsai., PNAS 84: 214-218 (1987); Nishimura és mtsai., Canc. Res. 47: 999-1005 (1987); Wood és mtsai., Nature 314: 446-449 (1985), és Shaw és mtsai., J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559 (1988)].

A kiméraantitest tovább humanizálható az antigén-kötésben nem közvetlenül szerepet játszó Fv-variábilis-régiónak humán eredetű Fv-variábilisrégió egyenértékű szekvenciáival történő helyettesítésével. Humanizált kiméraantitestek általános összefoglalói: Morrison, S.L., Science 229: 1202-1207 (1985) és Oi és mtsai., BioTechniques 4: 214 (1986). Az eljárás magában foglalja az immunglobulin nehézlánca vagy könnyűlánca közül legalább az egyikből származó Fv-variábilisrégiót vagy részét kódoló nukleinsav-szekvencia izolálását, azon műveletek végrehajtását (manipulálását) és expresszálasát. Az ilyen nukleinsav forrásai a szakember számára jól ismertek, és (a nukleinsav) nyerhető például 7E3-ből, amely GPIIbIIIa-elleni antitestet termelő hibridóma. A kiméraantitestet vagy fragmensét kódoló rekombináns DNS ezután alkalmas expressziós vektorba klónoozható. Alkalmas humanizált antitestek alternatív módon előállíthatóak CDR-helyettesítéssel

[5225539. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat; Jones és mtsai., Nature 321:552-525 (1986); Verhoeyan és mtsai., Science 239: 1534 (1988) és Beidler és mtsai., J. Immunol. 141: 4053-4060 (1988)].

Adott, humán eredetű antitest CDR-jei helyettesíthetők nem humán eredetű CDR legalább egy részével, vagy a CDR-ek egy része helyettesíthető nem humán eredetű CDR-ekkel. Csak az szükséges, hogy a humanizált antitest Fc-receptorhoz való kötéséhez szükséges számú CDR-eket helyettesítsük.

Antitest humanizálható bármely eljárással, amely alkalmas humán antitest legalább egy részének nem humán eredetű antitestből származó CDR-rel történő helyettesítésére. Winter olyan eljárást ír le, amely alkalmazható a találmány tárgyát képező humanizált antitestek előállítására [GB 2188638A. sz. egyesült királyságbeli szabadalmi bejelentés, 1987. március 26-án benyújtva], és amely közlemény tartalmára úgy hivatkozunk, mintha teljes terjedelmében a leíráshoz csatoltuk volna, és a kitanítás részét képezi. A humán eredetű CDR-ek helyettesíthetők nem humán eredetű CDR-ekkel oligonukleotid alkalmazásával történő helyspecifikus mutagenezissel.

A találmány oltalmi körébe tartoznak az olyan kiméra-antitestek és humanizált antitestek is, amelyekben specifikus antitestek vannak helyettesítve, deletálva vagy hozzáadva. Közelebbről az előnyös humanizált antitestek a vázszerkezet-régióban olyan aminosav-helyettesítéseket tartalmaznak, amelyek javítják az antigénkötést. Például egérere-

detű CDR-ekkel rendelkező humanizált antitestben a humán eredetű vázszerkezet-régióban elhelyezkedő aminosavak helyettesíthetők az egéredetű antitest megfelelő pozícióiban elhelyezkedő aminosavakkal.. Az ilyen helyettesítések köztudott módon bizonyos esetekben javítják a humanizált antitest antigénhez való kötődését. Módosított vagy megváltoztatott antitesteknek nevezzük azokat az antitesteket, amelyek esetében aminosavakatadtunk, deletáltunk vagy helyettesítettünk.

Célantigének

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a találmány szerinti a fúziós fehérje első tagja célba juttató hatóanyag, például céltárgyhoz nagy affinitással rendelkező polipeptid, például antitest, ligandum vagy enzim. Ennek megfelelően a találmány szerinti fúziós fehérje szelektív módon alkalmazható arra, hogy a fúziós fehérje második tagját nemkívánatos sejt közelébe irányítsa (lokalizálja).

Például az első tag lehet immunglobulin, amely kölcsönhatásba lép (pl. kötődik) célantigénnel. A találmány bizonyos megvalósítási módjai szerint a célantigén sejt felszínén, például rendellenes sejt, mint például hiperproliferatív sejt (pl. ráksejt) felszínén helyezkedik el. Példaként említhető célantigén többek között a karcinoembrionikus antigén (CEA), a TAG-72, a her-2/neu, az epidermális növekedési faktor receptora, a transzferrinreceptor. Előnyösen a célantigén karcinoembriotikus antigén.

A „célsejt” személyben (pl. emberben vagy állatban) lehet bármely nemkívánatos sejt, amely a találmány tárgyát képező fúziós fehérje céltárgyának tekinthető. Példaként említhető célsejt többek között a tumorsejtek, mint például a karcinóma- vagy adenokarcinóma-eredetű sejtek (pl. bél-, emlő- prosztatata-, ovárium- és méhnyálkahártya-ráksejtek) [Thor, A. és mtsai., Cancer Res 46: 3118 (1997) ; Soisson, A.P. és mtsai., Am. J. Obstet. Gynecol.: 1258-63 (1989)]. A „karcinóma” kifejezés a technikában elfogadott kifejezés és epitélszövetek vagy endokrin szövetek rosszindulatú elváltozásait jelöli, többek között a légzőszervi, gasztro-intesztinális, a nemi szervek és a húgyutak, a herék, az emlők, a petefészkek, a prosztatata, az endokrin rendszer karcinómáit és a melanómákat jelöli. Példaként említhető karcinómák többek között azok, amelyek a méhnyak, a tüdő, a prosztatata, a fej és nyak, a bél és a petefészek szövetéből alakulnak ki. A kifejezés magában foglal többek között karcinoszarkómákat, például többek között karcinóma- és szarkómaszövetekből felépülő rosszindulatú tumorokat. Az „adenokarcinóma” kifejezésen mirigyszövetből származó karcinómát, vagy olyan karcinómát értünk, amelyben a tumorsejtek felismerhető módon mirigyszerkezetet alakítanak ki. A „szarkóma” kifejezés a technikában elfogadott kifejezés, és mezenchima-eredetű rosszindulatú tumorokat jelöl.

Fúziós fehérjék előállítása

A fúziós fehérje első és második tagja lehet egymással összekapcsolva kapcsolóval, előnyösen kapcsolószekvenciával. A kapcsolószekvenciának a fúziós fehérje első és

második tagját olyan távolságban tartva kell elválasztania, hogy biztosítsa mindkét tag megfelelő módon összehajtogatódva („fold”) felvegye másodlagos és harmadlagos szerkezetét. Az előnyös kapcsolószekvenciák tulajdonságai: 1) flexibilis, kinyújtott konformációt kell felvenniük, 2) nem lehet hajlamuk olyan, rendezett másodlagos szerkezet felvételére, amely kölcsönhatásba léphet a funkcionális első és második taggal, és 3) minimális olyan hidrofobicitási vagy töltési tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek elősegítetik a funkcionális fehérjedoménekkel való kölcsönhatást. A flexibilis fehérjerégió tipikus felszíni aminosavai többek között a Gly, Asn és Ser. A Gly-t, Asn-t és Ser-t tartalmazó aminosav-szekvenciák permutációi várhatóan kielégítik a kapcsolószekvenciákkal szemben támasztott fenti ismérveket. Más, közel semleges aminosavak, mint a Thr és Ala, szintén alkalmazhatóak a kapcsolószekvenciában.

20 aminosavból álló kapcsolószekvencia alkalmazható a funkcionális fehérjedomének megfelelő elválasztása biztosítására, azonban szintén alkalmazhatóak hosszabb vagy rövidebb kapcsolószekvenciák. Az első és a második tagot elválasztó kapcsolószekvencia hossza lehet 5-500 aminosav, vagy előnyösen 5-100 aminosav. Előnyösen a kapcsolószekvencia körülbelül 5-30 aminosav hosszúságú. A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a kapcsolószekvencia körülbelül 5-20 aminosav hosszúságú, és előnyösen 10-20 aminosav hosszúságú. Az első és második tag kapcsolójaként alkalmazható aminosav-szekvenciák többek között, de nem kizárólagosan leírhatóak a $(\text{SerGly}_4)_y$ képlettel, ahol y 8 vagy na-

gyobb, vagy leírhatóak a Gly₄SerGly₅Ser képlettel. Az előnyös kapcsolószekvencia a (SerGly₄)₄ képlettel írható le. Egy másik, előnyös kapcsoló a (Ser-Ser-Ser-Ser-Gly)₃ szekvenciával rendelkezik.

Az első és második tag lehet fuzionáltatva közvetlenül, kapcsolószekvencia nélkül. Szükségtelenek a kapcsolószekvenciák, ha a fuzionáltatott fehérjék rendelkeznek olyan, nem esszenciális N- vagy C-terminális aminosavrégiókkal, amelyek alkalmazhatóak a funkcionális domének elválasztására, és megakadályozzák a sztérikus interferenciát. A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint az első tag C-terminálisa közvetlenül fuzionáltatható a második tag N-terminálisával, vagy megfordítva.

Rekombináns módon történő előállítás

A találmány szerinti fúziós fehérje előállítható standard rekombináns DNS-technikákkal a fúziós fehérjét kódoló nukleinsav-molekula alkalmazásával. Fúziós fehérjét kódoló nukleotidszekvencia szintetizálható standard DNS-szintézis eljárásokkal.

Fúziós fehérjét kódoló nukleinsav bejuttatható gazdasejtbe, például elsődleges vagy immortalizált sejt vonal sejtjébe. A rekombináns sejt alkalmazható a fúziós fehérje előállításában. Fúziós fehérjét kódoló nukleinsav bejuttatható gazdasejtbe például homológ rekombinációval. A legtöbb esetben a fúziós fehérjét kódoló nukleinsav rekombináns expressziós vektorban van beépítve.

A fúziós fehérjét kódoló nukleotidszekvencia lehet működőképesen kapcsolva egy vagy több, az expresszióban alkalmazandó gazdasejt alapján kiválasztott szabályozószekvenciával. A „működőképesen kapcsolva” kifejezésen azt értjük, hogy a fúziósfehérje-összetevő (vegyületet, „compound”) szabályozószekvenciához (szekvenciákhoz) van kapcsolva olyan módon, amely lehetővé teszi a fúziós fehérje expresszióját. A „szabályozószekvencia” kifejezésen promótereket, erősítőket („enhancer”) és más expressziós kontrollalelemeket értünk (pl. poliadenilációs szignált). Ilyen szabályozószekvenciák leírását találhatjuk meg a következő közleményben: Goeddel, „Gene Expression Technology”, Methods in Enzymology 185., kiad.: Academic Press, San Diego, CA (1990), amely közlemény tartalmára úgy hivatkozunk, mintha teljes terjedelmében a leíráshoz csatoltuk volna, és a kitanítás részét képezi. Szabályozószekvenciák többek között azok, amelyek nukleotidszekvenciák konstitutív expresszióját vezérlik gazdasejtek sok típusában, amelyek csak bizonyos gazdasejtekben vezérlik nukleotidszekvenciák expresszióját (pl. szövetspecifikus szabályozószekvenciák) és azok, amelyek szabályozható módon vezérlik nukleotidszekvenciák expresszióját (pl. csak indukáló hatású anyag jelenlétében). A szakember számára nyilvánvaló, hogy expressziós vektor tervezése olyan faktoroktól függ, mint a transzformálandó gazdasejt megválasztása, a kívánt fúziós fehérje expressziós szintje és ehhez hasonló. A fúziós fehérje expressziós vektora gazdasejtbe jut-

tatható, a nukleinsavak által kódolt fúziós fehérjék előállítására céljából.

Rekombináns expressziós vektorokat tervezhetünk fúziós fehérjék prokarióta vagy eukarióta eredetű sejtekben történő expressziója céljából. Például fúziós fehérjék expresszálhatóak baktériumsejtekben, mint az *E. coli*, rovarsejtekben (pl. bakulovírus-alapú expressziós rendszerben), élesztősejtekben vagy emlőseredetű sejtekben. Néhány alkalmas gazdasejt további leírása megtalálható a következő közleményben: Goeddel, „Gene Expression Technology”, *Methods in Enzymology* 185., kiad.: Academic Press, San Diego, CA (1990). A *S. cerevisiae* élesztőben történő expresszió célját szolgáló vektorokra példa többek között a *pYepSec1* [Baldari és mtsai., *EMBO J.* 6: 229-234 (1987)], a *pMFa* [Kurjan és Herskowitz, *Cell* 30: 933-943 (1982)], a *pJRY88* [Schultz és mtsai., *Gene* 54: 113-123 (1987)], és a *pYES2* (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Fúziós fehérjék tenyésztett rovarsejtekben (pl. *Sf9*- sejtekben) történő expressziója céljából hozzáférhető bakulovírus-alapú vektorok többek között a *pAc*-sorozat [Smith és mtsai., *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165 (1983)], és a *pVl*-sorozat [Luckow, V.A. és Summers, M.D., *Virology* 170: 31-39 (1989)].

Emlőseredetű (sejtekben alkalmazható) expressziós vektorok például többek között a *pCDM8* [Seed, B., *Nature* 329: 840 (1987)] és a *pMT2PC* [Kaufman és mtsai., *EMBO J.* 6: 487-195 (1987)]. Emlőseredetű sejtekben történő alkalmazás esetén az expressziós vektor kontrollfunkcióit gyakran virális szabályozóelemek biztosítják. Például a rendszerint

alkalmazásra kerülő promóterek poliómavírusból, 2-es adenovírusból, citomegalovírusból és a 40-es majomvírusból (*Simian Virus 40*) származnak.

A fent ismertetett szabályozó kontrollszekvenciákon kívül a rekombináns expressziós vektor tartalmazhat további nukleotidszekvenciákat. Például a rekombináns expressziós vektor kódolhat szelekciós jelzőgént a vektort befogadó gazdasejt azonosítása céljából. Ráadásul a fúziós fehérje gazdasejtből történő szekréciójának lehetővé tétele céljából adott, emlőseredetű gazdasejt esetében a rekombináns expressziós vektor kódolhat a fúziós fehérje amino-terminálisát kódoló szekvenciákkal működőképesen kapcsolt szignálszekvenciát, úgy, hogy az expresszió során a fúziós fehérje az amino-terminális végéhez fuzionáltatott szignálszekvenciával szintetizálódik. A szignálszekvencia a fúziós fehérjét a sejt szekréciós reakcióútjára vezérli, majd lehasad, lehetővé téve az érett fúziós fehérje (azaz a szignálszekvencia nélküli fúziós fehérje) gazdasejtből történő kiáramlását. Szignálszekvencia alkalmazása fehérjék vagy peptidek emlőseredetű sejtből történő szekréciójának lehetővé tétele céljából a technikában ismert eljárás.

Vektor-DNS juttatható be prokarióta vagy eukarióta eredetű sejtekbe hagyományos transzformációs vagy transzfekciós technikák alkalmazásával. A „transzformáció” és a „transzfekció” kifejezésen számos, a technikában elfogadott eljárást értünk, amely idegen nukleinsav (pl. DNS) gazdasejtbe történő bejuttatására szolgál, többek között kalcium-foszfáttal vagy kalcium-kloriddal történő

koprecipitáció, DEAE-dextrán által közvetített transzfekció, lipofekció, elektroporáció, mikroinjekció és vírus által közvetített transzfekció. Gazdasejt transzfekciójára vagy transzfekciójára alkalmas eljárások találhatók Sambrook kiadványában [Sambrook és mtsai., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. kiadás, kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)], és más laboratóriumi kézikönyvekben.

Az emlőseredetű sejteknek gyakran csak egy kis frakciója integrálja genomjában az idegen DNS-t. Az ilyen integránsok azonosítása és elválasztása céljából szelekciós jelző (pl. antibiotikum-rezisztencia) génjét juttathatjuk be gazdasejtbe a fúziós fehérjét kódoló génnel együtt. Előnyös szelekciós jelzők többek között azok, amelyek droggal szembeni rezisztenciát, mint például *G418*-cal, higromicinnel és metotrexáttal szembeni rezisztenciát kölcsönöznek. Szelekciós jelzőt kódoló nukleinsav gazdasejtbe juttatható a fúziós fehérjét kódoló vektorral vagy bejuttatható más vektorral. A bevitt nukleinsavval stabilan transzfektált drogszelekcióval (pl. a szelektálható jelzőgént beépítő sejtek túlélők, más sejtek elpusztulnak).

Rekombináns expressziós vektor transzkripciója és transzlációja megvalósítható *in vitro*, például a T7-promóter szabályozó szekvenciái és a T7-polimeráz alkalmazásával.

Transzgenikus emlősállatok

A következőkben nem humán jellegű transzgenikus állatok előállítására szolgáló eljárásokat írunk le. DNS-

konstrukciók bejuttathatóak emlősállat csíravonalába transzgenikus emlősállat előállítására céljából. Például a konstrukció egy vagy néhány kópiája beépíthető emlősállat embriója genomjába standard transzgenikus eljárások alkalmazásával.

Gyakran szükséges, hogy a transzgenikus fehérje az emlősállat tejében expresszáldjon. Előnyösek azok az emlősállatok, amelyek nagy mennyiségű tejet termelnek, és laktációs periódusuk hosszú. Előnyös emlősállatok a kérődzők, például a szarvasmarha, juh, teve vagy kecske, például Svájcban származó kecskék, például *Alpine*, *Saanen* és *Toggenburg* fajtájú kecskék. Más előnyös állatok többek között az ökör, a nyúl és a sertés.

A találmány példaként említhető megvalósítási módja szerint transzgenikus, nem humán jellegű állatot állítunk elő transzgen nem humán jellegű állat csíravonalába történő bejuttatásával. Embrióális célsejtekbe transzgen bejuttatható különböző fejlődési stádiumokban. Az embrionális célsejt fejlődési stádiumától függően különböző eljárásokat alkalmaznak. Bármely állat esetében az alkalmazott specifikus sejt (sejtvonal) megválasztásakor lehetőség szerint az általános jó egészségi állapotot, a jó embrióhozamot, az embrióban a pronukleusz jó láthatóságát és a jó reprodukciós képességet.

A fúziósfehérje-transzgen embrióba történő bejuttatása megvalósítható a technikában ismert változatos eljárások bármelyikével, mint például mikroinjektálással, elektroporációval vagy lipofekcióval. Fúziósfehérje-transzgen em-

lőszállatba juttatható például a konstrukciónak a megtermékenyített emlőszállat petesejtje (petesejtjei) pronukleuszába történő mikroinjektálással úgy, hogy a konstrukció egy vagy több kópiája a fejlődő emlőszállat (emlőszállatok) sejtjeiben fennmaradjon. A transzgenkonstrukció megtermékenyített petesejtbe történő bejuttatását követően a petesejt különböző időtartamokig inkubálható *in vitro* vagy visszaültethető „helyettes” gazdába, vagy mindkettőt megtehetjük. Az embriók *in vitro* inkubálásának egyik hagyományos eljárása az embriók 1-7 napig történő inkubálás, a fajtól függően, és azután a „helyettes” gazdába történő visszaültetésük.

A transzgenikus műveleteknek alávetett embriók utódai tesztelhetők a konstrukció jelenlétére szövetmetszeten végzett *Southern-blot* analízis végrehajtásával. Exogén módon klónozott konstrukció egy vagy több kópiáját genomjában stabilan beépítve tartalmazó embrió alkalmazható a transzgenikusan hozzáadott konstrukciót hordozó állandó, emlőseredetű vonal alapítására.

Transzgenikusan megváltoztatott emlőszállatok utódai születésük után vizsgálhatóak arra nézve, hogy a konstrukció beépült-e a leszármazottak genomjába. Ez végrehajtható úgy, hogy a fúziós fehérjét vagy szegmensét kódoló DNS-szekvenciának megfelelő próbát az utód kromoszómaanyagával hibridizáltatjuk. Megállapítottuk, hogy az emlőszállatok utódai, amelyek genomjukban a konstrukció legalább egy kópiáját tartalmazzák, érett állapotig felnőnek.

Az utódok közül a nőtények a kívánt fehérjét a tejükben vagy azzal együtt termelik. A transzgenikus emlősállatok tenyésztethetők más, olyan utódok létrehozása céljából, amelyek a kívánt fehérjét a tejükben termelik.

A transzgenikus nőtények tesztelhetők a tejbe történő fehérjeszekrécióra, a technikában ismert vizsgálati eljárások, például *Western-blot* vagy enzimatikus mérési eljárás alkalmazásával.

Más transzgenikus állatok

Fúziós fehérje expresszálnak sokféle transzgenikus állatban. Transzgenikus sertés előállítására szolgáló előirat található a következő közleményekben: White és Yannoutsos, *Current Topics in Complement Research: 64th Forum in Immunology*, 88-94; 5523223. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat; 5573933. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat; WO93/25071. sz. nemzetközi szabadalmi bejelentés, és a WO95/04744. sz. nemzetközi szabadalmi bejelentés. Transzgenikus egér előállítására szolgáló előirat található az 5530177. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban. Transzgenikus patkány előállítására szolgáló előirat található a következő közleményben: Bader és Ganten: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 3. mell.: S81-S87 (1996). Transzgenikus szarvasmarha előállítására szolgáló előirat található a következő közleményben: *Transgenic Animal Technology*, "A Handbook, szerk.: Carl A. Pinkert, kiad.: Academic Press, Inc. Transzgenikus nyúl előállítására szolgáló előirat található a következő közleményekben: Hammer

és mtsai., Nature 315: 680-683 (1985) és Taylor és Fan, Frontiers in Bioscience, 2: 298-308 (1997).

Transzgenikus fehérje transzgenikus állat tejében történő előállítás

Tejspecifikus promóterek

Azok az alkalmas transzkripciós promóterek, amelyek elsődlegesen emlőhámsejtekben aktiválódnak, többek között azok a promóterek, amelyek tejfehérjéket, többek között kazeineket, béta-laktoglobulint [Clark és mtsai., Bio/Technology 7: 487-492 (1989)], savas tejsavófehérje [Gorton és mtsai., Bio/Technology 5: 1183-1187 (1987)] és laktalbumint [Soulie és mtsai., FEBS Letts. 297: 13 (1992)] kódoló géneket szabályoznak. Bármely fajból származó alfa-, béta-, gamma- vagy kappa-kazein-gén promótere alkalmazható emlőben történő expresszió biztosítására; előnyös promóter a kecskeeredetű béta-kazein-gén promótere [DiTullio, Bio/Technology 10: 74-77 (1992)]. Tejspecifikus fehérjepromóter vagy olyan promóterek, amelyek specifikusan emlőhámszövetben aktiválódnak, izolálhatóak cDNS-ből vagy genomi szekvenciákból. Előnyösen ezek genomi eredetűek.

DNS-szekvencia-információk hozzáférhetőek az alábbiakban felsorolt emlőmirigy-specifikus gének esetében, legalább egy, de gyakran több szervezet esetében. Lásd például: patkányeredetű α -laktalbumin: [Richards és mtsai., J. Biol. Chem. 256: 526-532 (1981)]; patkányeredetű WAP: [Campbell és mtsai., Nucleic Acids Res. 12: 8685-8697 (1984)]; patkányeredetű β -kazein [Jones és mtsai., J. Biol. Chem. 260: 7042-7050 (1985)]; patkányeredetű γ -kazein: [Yu-

Lee és Rosen. J. Biol. Chem. 258: 10794-10804 (12983)]; hu-
mán eredetű α -laktalbumin: [Hall, Biochem. J. 242: 735-742
(1987)]; marhaeredetű α s1- és κ -kazein-cDNS-ek: [Stewart,
Nucleic Acids Res. 12: 389 (1984)]; marhaeredetű β -kazein:
[Gorodetsky és mtsai., Gene 66: 87-96 (1988)]; marhaeredetű
 κ -kazein: [Alexander és mtsai., Eur. J. Biochem. 178: 395-
401 (1988)]; marhaeredetű α S2-kazein: [Brignon és mtsai.,
FEBS Lett. 188: 48-55 (1977)]; marhaeredetű β -laktoglobulin
[Ivanov és mtsai., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369: 425-429
(1988), Alexander és mtsai., Nucleic Acids Res. 17:
6739(1989)]; marhaeredetű α -laktalbumin [Vilotte és mtsai.,
Biochimie 69: 609-620 (1987)]. A különböző tejfehérjégeknek
szerkezete és funkciója összefoglalóját lásd: Mercier és
Vilotte, J. Dairy Sci. 76: 3079-3098 (1993), amely közle-
mény tartalmára úgy hivatkozunk, mintha teljes terjedelmé-
ben a leíráshoz csatoltuk volna, és a kitanítás részét ké-
pezi. Ha további szegélyezőszekvenciák (*flanking*) alkalmaz-
hatóak az expresszió optimalizálásában, az ilyen szekvenci-
ák klónozhatóak a meglevő szekvenciák próbaként való alkal-
mazásával. Különböző szervezetekből származó emlőmirigy-
specifikus szabályozószekvenciákat úgy kaphatunk, ha az
ilyen szervezetekből származó könyvtárakat szkrínélünk is-
mert, közös nukleotidszekvenciákkal vagy antitestekkel.

Szignálszekvenciák

Alkalmazható szignálszekvenciák a tejspecifikus szek-
venciák vagy más szignálszekvenciák, amelyek eukarióta-
vagy prokarióta eredetű fehérjék szekrécióját eredményezik.
Előnyösen a szignálszekvencia tejspecifikus szignál-

szekvencia, például olyan gén szignálszekvenciája, amely tejbe szekretálódó terméket kódol. A legelőnyösebben a tejspecifikus szignálszekvencia a találmány tárgyát képező expressziós rendszerben alkalmazott tejspecifikus promóterrel rokon. A szignálszekvencia mérete a találmány szempontjából nem kritikus. Csak az fontos, hogy a szekvencia ahhoz elegendő méretű legyen, hogy a kívánt rekombináns fehérje szekrécióját például az emlőszövetben megvalósítsa. Például kazeineket, például alfa-, béta-, gamma- vagy kappa-kazeineket, béta-laktoglobulint, savas tejsavófehérjét és laktalbumint kódoló gének szignálszekvenciái alkalmazhatóak a találmány megvalósításában. Előnyös szignálszekvencia a kecskeeredetű β -kazein szignálszekvenciája.

Más, szekretálódó fehérjék, például immunglobulinok vagy májsejtek, vesesejtek vagy hasnyálmirigysejtek által szekretált fehérjék szignálszekvenciái szintén alkalmazhatóak.

Szigetelőszekvenciák

A találmány szerinti DNS-konstrukció ráadásul tartalmaz legalább egy szigetelőszekvenciát. A „szigetelő”, „szigetelőszekvencia” és „szigetelőelem” kifejezéseket felcserélhető módon alkalmazzuk. A szigetelőelem olyan kontrollelem, amely szigeteli a hatókörébe helyezett gének transzkripcióját, azonban nem gyakorol sem pozitív, sem negatív hatást a génexpresszióra. Előnyösen a szigetelőszekvencia a transzkripcióra kerülő DNS-szekvencia bármelyik oldalára beilleszthető. Például a szigetelő pozíció-

nálható a promótertől 5'-irányban körülbelül 200 bp-tól 1 kb-ig, és az adott gén végétől 3'-irányban a promótertől legalább körülbelül 1 kb-tól 5 kb-ig. A szakember számára a szigetelőszekvencia promótertől és az adott gén 3'-végtől való távolsága meghatározható az adott gén és a konstrukcióban alkalmazott promóter és erősítő („enhancer”) relatív méretétől függően. Ráadásul a promótertől 5'-irányban és a transzgén 3'-végén két vagy több szigetelőszekvencia pozicionálható. A szigetelő- vagy szigetelők a transzgén 3'-végén pozicionálható az adott gén 3'-végén vagy a 3'-irányú szabályozószekvencia 3'-végén, például 3'-irányú nem transzlálódó régió (UTR) vagy 3'-irányú szegélyező („flanking”) szekvencia végén.

Előnyös szigetelő az olyan DNS-szegmens, amely a csirkeeredetű β -globin-lókuszt 5'-végét övezi, és a csirkeeredetű 5'-irányú konstitutív hiperszenzitív helynek felel meg, amint az a 94/23046. sz. nemzetközi szabadalmi iratban van leírva, amely közlemény tartalmára úgy hivatkozunk, mintha teljes terjedelmében a leíráshoz csatoltuk volna, és a kitanítás részét képezi.

DNS-konstrukciók

Fúziós fehérje expresszálnak olyan konstrukció által, amely magában foglal emlőhámshám-specifikus promóter, például kazeinpromóter, például kecskeeredetű béta-kazein-promóter, tejspecifikus szignálszekvenciát, például kazein-szignálszekvenciát, például β -kazein-szignálszekvenciát, és fúziós fehérjét kódoló DNS-t.

A konstrukció tartalmazhat a nem szekretálódó fehérjét kódoló DNS-től 3'-irányban (*downstream*) 3'-irányú nem transzlálódó régiót is. Az ilyen régiók stabilizálhatják az expressziós rendszer RNS-átiratát, és így növelik a kívánt fehérje hozamát az expressziós rendszerben. A találmány szerinti konstrukcióban alkalmazható, 3'-irányú nem transzlálódó régiók között vannak olyan szekvenciák, amelyek poli-A-szignált biztosítanak. Az ilyen szekvenciák származhatnak például az SV40 kis t-antigénjéből, a kazein 3'-irányú nem transzlálódó régiójából vagy a technikában ismert más, 3'-irányú nem transzlálódó régióból. Előnyösen a 3'-irányú nem transzlálódó régió tejspecifikus fehérjéből származik. A 3'-irányú nem transzlálódó régió hossza nem kritikus, azonban a poli-A-átirata stabilizáló hatása fontosnak látszik az expressziós szekvencia RNS-e stabilizálásában.

Konstrukció tartalmazhat 5'-irányú nem transzlálódó régiót a promóter és a szignálszekvenciát kódoló DNS között. Az ilyen nem transzlálódó régiók származhatnak ugyanabból a kontrollrégióból, mint a promóter, vagy származhat különböző génből, például származhatnak más szintetikus, félszintetikus vagy természetes forrásból. Specifikus hosszuk itt sem kritikus, azonban hasznosnak látszanak az expresszió szintjének javításában.

Konstrukció tartalmazhat az emlőseredetű hámszövetben elsődlegesen expresszálni kívánt gén N-terminális kódoló régiójának 10%-át, 20%-át, 30%-át vagy nagyobb részét is. Például az N-terminális kódoló régió megegyezhet az alkalmazott

promóter, például kecskeeredetű β -kazein N-terminális kódoló régiójával.

A technika állása szerinti eljárások magukban foglalhatják konstrukció elkészítését és tesztelését termék tenyésztett sejtekben történő termelése szempontjából, a konstrukció transzgenikus állatba történő bevitele előtt. Meglepő módon arra a megállapításra jutottunk, hogy ilyen előirat nem rendelkezik előrejelző értékkel arról, hogy normális körülmények között nem szekretálódó fehérje szekretálható-e például transzgenikus állat tejében. Így szükséges lehet a konstrukció direkt tesztelése transzgenikus állatban, például transzgenikus egérben, mivel bizonyos konstrukciók, amelyek nem szekretálódnak CHO-sejtekben, szekretálódnak transzgenikus állatok tejében.

Tejből történő tisztítás

A transzgenikus fúziós fehérje viszonylag nagy koncentrációban és nagy térfogatban előállítható tejben, normális módon processzált peptid folyamatos, magas szintű termelését biztosítva, ahol a peptid könnyen kinyerhető megújuló forrásból. A technikában ismert néhány különböző eljárás a fehérjék tejből történő izolálására.

A tejfehérjéket rendszerint kombinált eljárások alkalmazásával izolálják. A nyers tejet először frakcionálják a zsírok eltávolítása céljából, például fölözéssel, centrifugálással, ülepítéssel [Swaisgood, H.E., „Chemistry of Milk Protein”, Developments in Dairy Chemistry, I. kiad.: Applied Science Publishers, NY (1982)], savas kicsapással [4644056. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat] vagy rennin vagy kimotripszin

irat] vagy rennin vagy kimotripszin alkalmazásával történő enzimikus koagulálással [Swaisgood, u.o.]. Ezután a fő tejfehérjék frakcionálhatók akár tiszta oldatba vagy tömeges csapadékba, amelyből az adott, specifikus fehérje könnyen tisztítható.

Az USSN 08/648235. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés oldható tejösszetevő, mint például peptid teljes tejből vagy tejfrakcióból tangenciális áramlási („flow”) szűréssel történő izolálására szolgáló eljárást tár fel. A korábbi izolálási eljárásoktól eltérően ez kiküszöböli a teljes tej első, zsír- és kazeinmicellák eltávolítását szolgáló frakcionálását, ezáltal egyszerűsíti az eljárást és elkerüli a kitermelési és a bioaktivitási veszteséget. Ez az eljárás alkalmazható további tisztítási lépésekkel kombinálva szennyezők további eltávolítására és az adott összetevő tisztítására.

Transzgenikus fehérje termelése transzgenikus állat tojásában

Fúziós fehérje előállítható szövetekben, váladékokban vagy a transzgenikus állat más termékeiben, például tojásban. Például fúziós fehérje termelhető transzgenikus állat, előnyösen pulyka, kacsa, liba, strucc, gyöngytyúk, páva, fogoly, fácán, galamb tojásaiban, és előnyösen transzgenikus csirke tojásaiban, a technikában ismert eljárások alkalmazásával [Sang és mtsai., Trends Biotechnology 12: 415-20 (1994)]. Specifikusan tojásban expresszáldó fehérjéket kódoló gének, mint a tojássárga-fehérje-gének és

az albuminfehérje-gének módosíthatóak a fúziós fehérje direkt expressziója céljából.

Tojásspecifikus promóterek

Alkalmazható transzkripcionális promóterek azok a promóterek, amelyek elsődlegesen tojásban aktiválódnak, többek között azok a promóterek, amelyek a tojás fehérjéit, például az ovalbumint, a lizozimot és az avidint kódoló géneket szabályozzák. Előnyösek a csirkeeredetű ovalbumin, lizozim vagy avidin génjéből származó promóterek. A tojásspecifikus fehérje promóterei vagy a tojásszövetben specifikusan aktiválódó promóterek származhatnak cDNS-ből vagy genomi szekvenciákból. Előnyösen a tojásspecifikus promóterek genomi eredetűek.

A tojásspecifikus gének DNS-szekvenciái a technikában jól ismertek [lásd pl. Burley és mtsai., „The Avian Egg”, kiad.: John Wiley and Sons, 472 (1989), amely közlemény tartalmára úgy hivatkozunk, mintha teljes terjedelmében a leíráshoz csatoltuk volna, és a kitanítás részét képezi]. Ha további szegélyezőszekvenciák (*flanking*) alkalmazhatók az expresszió optimalizálásában, az ilyen szekvenciák klónozhatók a meglevő szekvenciák próbaként való alkalmazásával. Különböző szervezetekből származó tojásspecifikus szabályozószekvenciákat úgy kaphatunk, ha az ilyen szervezetekből származó könyvtárakat szkrínélünk ismert, közös nukleotidszekvenciákkal vagy antitestekkel.

Transzgenikus növények

Fúziós fehérje expresszálható transzgenikus szervezetben, például transzgenikus növényben, például olyan

transzgenikus növényben, amelyben a transzgén-DNS-t nukleáris- vagy plasztidgenomba illesztettük. A növények transzformációja a technikában jól ismert, lásd általában a következő közleményeket: „Recombinant DNA Part D”, Methods in Enzymology 153: kiad.: Academic Press, és az EP 693554. sz. európai szabadalmi bejelentés.

Idegen nukleinsav növényi sejtbe vagy protoplasztba juttatható néhány eljárás alkalmazásával. Például nukleinsav mechanikusan átvihető növényi sejtbe mikroinjektálással direkt módon a mikropipetták alkalmazásával. Idegen nukleinsav növényi sejtbe juttatható poli-etilénglikol alkalmazásával, amely a genetikai anyaggal precipitációs komplexet képez, amelyet a sejt felvesz [Paszkowski és mtsai., EMBO J. 3: 2712-22 (1984)]. Idegen nukleinsav növényi sejtbe juttatható elektroporációval [Fromm és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5824 (1985)]. Ezzel az eljárással növényi protoplasztokat elektroporációnak vetnek alá a releváns genetikai konstrukciót tartalmazó plazmidok vagy nukleinsavak jelenlétében. Nagy térerősségű elektromos impulzusok reverzibilisen átjárhatóvá teszik a biológiai membránokat plazmidok bejuttatását lehetővé téve. Az elektroporációnak alávetett növényi protoplasztok a sejtfalat újra kialakítják, osztódnak, és növényi kalluszt képeznek. A transzformált génnel transzformált növényi sejtek szelekciója végrehajtható fenotípusos jelzők (*marker*) alkalmazásával.

Karfiol-mozaikvírus (*CaMV*) alkalmazható vektorként idegen nukleinsavak növényi sejtekbe történő bejutatására [Hohn és mtsai., Molecular Biology of Plant Tumors, kiad.:

Academic Press, New York 549-560 (1982); Howell, 4407956. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat]. A virális CaMV-DNS-genomot a „szülői” (parent) bakteriális plazmidba helyezzük, olyan rekombináns DNS-molekulát alkotva, amely baktériumokban szaporítható. A rekombináns plazmid további módosításoknak vethető alá a kívánt DNS-szekvencia bevitelével. A rekombináns plazmid módosított virális részét ezután kivágjuk a szülői bakteriális plazmidból, és a növényi sejtek vagy növények beoltásában alkalmazzuk.

Kis részecskék nagy sebességű ballisztikus penetrációját alkalmazhatjuk idegen nukleinsavak növényi sejtekbe történő bejuttatására. Nukleinsavakat helyezünk el kis gyöngyök vagy részecskék mátrixában vagy felszínén [Klein és mtsai., Nature 327: 70-73 (1987)]. Jellemző módon az új nukleinsav-szegmens egyetlen alkalommal történő bevitele szükséges, azonban az eljárás többszöri bevittet is lehetővé tesz.

Nukleinsav növényi sejtbe juttatható a növényi sejtnek, explantátumnak, merisztémának vagy magnak a nukleinsavval transzformált *Agrobacterium tumefaciens*-sel történő fertőzésével. Alkalmas körülmények között a transzformált növényi sejteket hajtások, gyökerek formálása céljából növesztjük, és tovább fejlesztjük növényekké. A nukleinsavak növényi sejtbe juttathatóak például az *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plazmidja által. A Ti-plazmid a növényi sejtekbe jut át *Agrobacterium tumefaciens*-sel történő fertőzéskor, és stabilan integrálódik a növényi sejt genomjában

[Horsch és mtsai., „Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants”, Science 233: 496-498 (1984); Fraley és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803 (1983)].

Az olyan növények, amelyekből protoplasztokat izolálhatunk és tenyészhetünk teljes, regenerált növények elérésére, transzformálhatóak úgy, hogy az átvitt idegen gént tartalmazó, teljes növény visszanyerhető. Alkalmas növények többek között például a *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Hererocallis*, *Nemesia*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browaalia*, *Glycine*, *Lolium*, *Zea*, *Sorghum* és *Datura* nemzetségekből származó fajok.

Növények tenyésztett protoplasztokból történő regenerálásának leírását találjuk a következő közleményekben: Evans és mtsai., „Protoplast Isolation and Culture”, Handbook of Plant Cell Cultures 1: 124-176, kiad.: MacMillan Publishing Co., New York (1983); Davey, M.R., „Recent Development in the Culture and Regeneration of Plant Protoplasts”, Protoplast - Lecture Proceedings, 12-29, kiad.: Birkhauser, Basel (1983); Dale, P.J., „Protoplast Culture and Plant Regeneration of Cereals and Other Recalcitrant Crops”, Protoplast - Lecture Proceedings, 31-41 kiad.: Birkhauser, Basel (1983), és Binding, H.,

„Regeneration of Plants”, Plant Protoplasts, 21-73, kiad.: CRC Press, Boca Raton (1985).

A protoplasztból történő regenerálás fajról fajra változik, azonban általában először az exogén szekvenciát tartalmazó transzformált protoplaszt-szuszpenziót állítjuk elő. Bizonyos fajokban a protoplaszt-szuszpenzióból embrió kialakulása indukálható, a természetes embriókhoz hasonlóan az érés stádiumáig. A tápközeg tartalmazhat különböző aminosavakat és hormonokat, mint például auxinokat és citokinineket. Előnyös lehet, ha a tápközeghez glutaminsavat és prolint adunk, különösen az olyan fajoknál, mint a kukorica és a lucerna. A hajtások és a gyökerek normális körülmények között egyidejűleg fejlődnek ki. A hatékony regenerálódás a tápközegtől, a genotípustól és a tenyésztés múltjától függ. Ha ezeket a változókat szabályozzuk, a regenerálódás teljes mértékben reprodukálható és megismételhető.

Vegetatív módon szaporított állomány esetében az érett transzgenikus növényeket szaporíthatjuk dugványok vételével vagy szövettenyésztési eljárásokkal több, azonos növény kísérletek céljára történő előállítására, például termelési jellemzőkre történő tesztelésre. A kívánt transzgenikus növény kiválasztása így történik, és így új változatokat kapunk, amelyeket kereskedelmi forgalomban történő eladás céljából vegetatív módon szaporítjuk. Magról szaporított állományok esetében az érett, transzgenikus növényeket önmegporzásnak vetjük alá (önkeresztezés, „self cross”) homozigóta, beltenyésztett növények létrehozása

céljából. A beltenyésztett növények olyan magokat hoznak, amelyek tartalmazzák az újonnan bevitt idegen génaktivitási szintet kódoló gént. Ezek a magok csíráztathatóak és felneveszthetők a kiválasztott fenotípussal rendelkező növények előállítása céljából. A találmány szerinti beltenyésztett példányok alkalmazhatóak új hibridek kifejlesztésére. Ebben az eljárásban kiválasztott beltenyésztett vonalat keresztezzünk más beltenyésztett vonallal a hibrid előállítása céljából.

A transzgenikus növényből nyert részek, mint a virágok, magok, levelek, ágak, gyümölcsök, és ehhez hasonlóak a szintén a találmány tárgyát képezik, feltéve, hogy ezek a részek magukban foglalnak ilyen módon transzformált sejteket. A regenerált növények leszármazottjai és változatai szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak, feltéve, hogy ezek a részek tartalmazzák a bevitt DNS-szekvenciákat. A regenerált növények leszármazottjai és változatai szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak.

Transzgenikus növények vagy növényi sejtek kiválasztása alapulhat vizuális megfigyelésen, mint például a színváltozások megfigyelése (pl. fehér virág, változó pigmenttermelés, és egyforma színmintázat vagy szabálytalan mintázatok), azonban az enzimaktivitás biokémiai mérési eljárásai vagy a termésmennyiség meghatározása is szerepet játszhat. A transzgenikus növényeket vagy növényi sejteket a lényeges növényi részt hordozó növényekké növesztjük, és a génaktivitásokat, megfigyeljük, például vizuális megfigyeléssel (flavonoidgénekre) vagy biokémiai mérési eljárások-

kal (Northern-blotok, Western-blotok, enzimes mérési eljárások és flavonoidösszetevők vizsgálata, többek között spektroszkópia) [lásd: The Flavonoids, 1. és 2., szerk.: Harborne és Mtsai., kiad.: Academic Press.] Az alkalmas növényeket kiválasztjuk és további értékelésnek vetjük alá. Genetikai műveleteknek alávetett növények előállítására szolgáló eljárások további leírásához lásd: 5283184. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat, az 5482852. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat, és az EP 693554. sz. európai szabadalmi bejelentés, amely közlemények tartalmára úgy hivatkozunk, mintha teljes terjedelmében a leíráshoz csatoltuk volna, és a kitanítás részét képezik.

Az alábbi példák a találmány szerinti megoldás további illusztrálását szolgálják, de nem szűkítik az oltalmi kört. Minden hivatkozást (többek között az irodalmi hivatkozásokat, a megadott szabadalmak leírásait, a közzétett szabadalmi bejelentéseket és az egyidejűleg függőben levő szabadalmi bejelentéseket) a szabadalmi iraton belül úgy idézünk, mintha teljes terjedelmében a leíráshoz csatoltuk volna, és azok a kitanítás részét képezik.

1. Példa

Antitest-karboxipeptidáz-B-fúzió létrehozása és tesztelése

F(ab')₂-enzim-fúziósfehérjét szubklónoztunk BC350 elnevezésű, kecskeeredetű béta-kazein-expressziósvektorba. A 3 konstrukció mindegyikében: a 213-asban (MF21q3-13, Fd-enzim-fúziósgén), az LC-ben (LC3, könnyűlánc) és a 141-

esben (*MF141-4*, prodomén C-terminális leucinnal) az expressziós kazettát a bakteriális plazmidgéntől elválasztottuk. A három transzgént egérzigótákban vittük ko-mikroinjektálással. Hét transzgenikus egérvonalat vizsgáltunk, amelyek az $F(ab')_2$ -enzim-fúziósfehérje-antitest mindhárom alegységét hordozza, és 3 olyan vonalat, amelyek csak az *LC*- és a *213*-as transzgént hordozták. Tejet gyűjtöttünk az alapító és az első generációs nőstényektől, és *ELISA*-ban és enzimaktivitási mérési eljárásokban teszteltük. A 3 transzgént hordozó hét vonalból négy az $F(ab')_2$ -enzim-fúziósfehérjét magasabb, mint 1 mg/ml (lehetséges módon 4-6 mg/ml-ig) szinten, míg a csak az *LC*- és a *213*-as transzgént hordozó vonalak alacsonyabb, mint 0.1 mg/ml szinten expresszálják.

Létrehoztuk a humán eredetű karboxipeptidáz-B-enzimmel fuzionált, karcino-embriotikus antigén elleni (CEA) humanizált $F(ab')_2$ -t tartalmazó humanizált antitest-fragmens-enzim-fúziósfehérjét [$F(ab')_2$ -CPB] expresszáló transzgenikus egereket. A transzgenikus egereket úgy hoztuk létre, hogy a három, kecskeeredetű béta-kazein-emplómirigy expressziós konstrukcióval ko-mikroinjekciót hajtottunk végre. Az egyik konstrukció, a *141*-es elnevezésű (*MF141-1*, prodomén a C-terminális leucinnal) a CPB prodoménjét expresszálta, a másik két konstrukció, a *LC* és a *213*-as elnevezésű (könnyűlánc és Fd-enzim-fúziósgén) az antitest-CPB-fúziósfehérjét expresszálta. A korábban végrehajtott kísérletek során kimutattuk, hogy a CPB-prodomén *in trans*



történő expressziója szükséges a fúziós fehérjék érett CPB-n alapuló megfelelő hajtogatódásához (*folding*).

Anyagok és módszerek

A restrikciós enzimeket a *New England Biolabs*-tól (*Beverly, MA*) szereztük be. A nylon-anyagú membránokat (*MagnaGraph* nylon-transzfermembránok) a *Micron Separation Inc*-től (*MSI, Westboro, MA 01581*) szereztük be. Az alfa-³²P-dATP-t a *NEN Life Science Products, Inc.*-től szereztük be. (*Boston, MA*). A szekvenálást a *Sequen Company* (*Worcester, MA*) végezte el. Az *MF21q3-16Fd*-enzim-fúziós-gént tartalmazó 213-as, és a 806077-es könnyűlánc-kódolórégiót tartalmazó LC-t és a 141-es elnevezésű plazmidokat a *Zeneca Pharmaceuticals*-től szereztük be. A *CD1*-egereket a *Charles River Labs.*-től (*Wilmington, MA*) szereztük be.

Az injektálási célú fragmensek előállítása

A plazmid-DNS-t Dr. Michael D. Edge-től (*Zeneca Pharmaceuticals*) kaptuk, és az expressziós kazettákat (mindegyik 100 µg) a vektorváztól *Sal-I*-gyel történő teljes emésztéssel választottuk el. Az emésztett plazmidot ezután agarózgélben elektroforézisnek vetettük alá, 1xTAE-t alkalmazva futtatópufferként (Maniatis, 1982). Az expressziós kazettának megfelelő DNS-fragmenst tartalmazó gélrégiót UV-fényben (közele UV) tettük láthatóvá. A keresett DNS-t tartalmazó sávot kivágtuk, dialízistasakba tettük és a DNS-t 1xTAE-pufferben elektroelúció alkalmazásával izoláltuk. Ezt az eljárást alkalmaztuk minden expressziós kazetta esetében.

Az elektroelúció után a DNS-fragmenseket a *Wizard DNA clean-up system* („bűvös DNS-tisztítórendszer”, *Promega*, A7280. katalógusszám) alkalmazásával tisztítottuk és töményítettük, a gyártó által mellékelte előírat alkalmazásával, és 125 µl mikroinjektálási pufferben eluálva (10 mM Tris, pH 7.5, 0.2 mM EDTA). A fragmensek koncentrációját összehasonlító agarózgél-elektroforézis alkalmazásával határoztuk meg. A mikroinjektálási fragmensek törzsoldatainak megállapított koncentrációi: LC: 15 ng/ml; 141: 180 ng/ml; 213: 270 ng/ml. A törzsoldatokat közvetlenül a pronukleuszba történő injektálás előtt együttes hígításnak vetettük alá mikroinjektálási pufferben úgy, hogy minden fragmens végső koncentrációja 0.5 ng/ml legyen.

Mikroinjektálás

Nőstény *CD1*-egereknél szuperovulációt idéztünk elő, és megtermékenyített petesejteket távolítottunk el az *oviductus*-ból. A hím pronukleuszokat ezután a mikroinjektálási pufferben hígított DNS-sel mikroinjektálásnak vetettük alá. A mikroinjektálásnak alávetett embriókat vagy egy éjszakán át növesztettük CZB-tápközegben, vagy azonnal áterhes *CD1*-egerek (recipiensek) *oviductus*-ába vittük. 20-30 2-sejtes, vagy 40-50 egysejtes embriót vittünk át minden recipiens nősténybe és a vemhességet terminusig engedték kifejlődni.

Az alapítóállatok azonosítása

Genomiális DNS-t izoláltunk farokszövetből izopropanollal történő kicsapással, és polimeráz-láncreakció (PCR) alkalmazásával vizsgáltuk csirkeeredetű béta-globin-

eredetű DNS-szigetelőszekvencia („insulator”) jelenlétére. Ez a szekvencia a kecskeeredetű béta-kazein-vektor (GBC-350) része. A PCR-reakciók céljára megközelítőleg 250 ng genimoális DNS-t hígítottunk 50 µl PCR-pufferben (20 mM Tris, pH 8.3, 50 mM KCl és 1.5 mM MgCl₂, 100 µM dezoxinukleotid-trifoszfátok és minden láncindító 600 nM koncentrációban), 2.5 egység *Taq*-polimeráz alkalmazásával, és a reakciót az alábbi hőmérsékleti program alkalmazásával hajtottuk végre:

1 ciklus	94°C	60 másodperc
5 ciklus	94°C	30 másodperc
	58°C	45 másodperc
	74°C	45 másodperc
30 ciklus	94°C	30 másodperc
	55°C	30 másodperc
	74°C	30 másodperc

lácindítókészletek:

GBC-332-es és GBC-386-os, az amplikon 206 bp

GBC332: TGTGCTCCTCTCCATGCTGG (___ . azonosítószámú szekvencia, ezentúl a. sz.)

GBC386: TGGTCTGGGGTGACACATGT (___ . a.sz.sz.)

A transzgenikus alapítók Southern-blot-analízise

Minden, a szigetelőszekvencia-PCR-re nézve pozitív alapítóegérből genomiális DNS-t (24 µg összesen, 8 µg/sáv)

teljes mértékben emésztettünk *EcoR-I*-es restriktációs enzim-mel. Az emésztett DNS-eket három mintában (triplikátumban) elektroforézisnek vetettünk alá és standard eljárásoknak megfelelően nylon anyagú membránokra vittünk (Maniatis és mtsai., 1982). Izoláltunk minden expressziós kazettára specifikus próbákat: a *VK*-ból (*LC10* a *pDP72*-ben, 72 bp próba), *ProL*-ből (*pMF141-4* a *pSP72*-ben, 342 bp próba) és az *fd-CPB*-ből (*pMF213-20* a *pS72*-ben, 1981 bp próba), a plazmidokból (melyeket Micael D Edge bocsátott rendelkezésünkre a *Zeneca Pharmaceuticals*-től) *SAL-I*-gyel, *Xho-I*-gyel, illetve *Xho-I*-gyel történő hasítással. Minden próbát megjelöltünk a *Prime-It''-II*-reagenskészlet (*Stratagene, La Jolla, CA 92037*) alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint, és egy adag nylon anyagú szűrőre hibridizáltuk 50% formamidban, 42°C-on, standard eljárásoknak megfelelően (Maniatis és mtsai., 1982). A mosásokat 60°C-on, 0.2xSSC-ben, 0.1% SDS-sel hajtottuk végre.

Tej fejése az egerek esetében

A nőtény egerek a kölyköket természetes úton, beavatkozás nélkül világra hozták, és általában az ellés után a 7. és a 8. napon fejtünk tejet. A fejési eljárás előtt az egereket az alomból körülbelül egy órára elválasztottuk. Az egy órás várakozási idő után az egereknél laktációt idéztünk elő úgy, hogy intraperitoneálisan 5 IU oxitocint adtunk be PBS-ben (foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldat), 25-ös méretű tű alkalmazásával. A hormoninjekciót követően 1-5 percig várakoztunk, hogy az oxitocin hatását kifejthesse. Olyan szívó- és gyűjtőrendszert alkalmaztunk a tejgyűj-

tésre, amely 15 ml-es, kónuszos csőből, az azt lezáró, 18-as („gauge”) tűkkel felszerelt gumidugóból állt, és az egyik tű tompa végét humán alkalmazású mellpumpához csatlakoztatott gumicsőbe volt illesztve. Az egereket a ketrec tetejére helyeztük, csak a farkuknál fogva tartottuk, és más módon nem korlátoztuk vagy kényszerít nem alkalmaztunk. Egy másik tű tompa végét az egerek csecsbimbójába (egyszerre egyet) illesztettünk abból a célból, hogy a tejet a 15 ml-es kónuszos csőbe helyezett egyedi Eppendorf-csőbe gyűjtsük. Minden mintagyűjtés után az Eppendorf-csöveket cseréltük. A tejgyűjtést addig folytattuk, amíg végül 150 μ l tejet gyűjtöttünk. A tejgyűjtés után az egereket az alomba visszahelyeztük.

Az egérembriók mikroinjekciója

A fragmenseket 1708 egérembrióba koinjektálással bejuttattuk, amelyek közül 945-öt 31 recipiens nőténybe bejuttattunk. A nőtények közül 27 kihordta a magzatokat és 172 élő kölyköt világra hozott, ezek közül 20 volt transzgenikus a PCR-analízis szerint. Az injektált embriók közül 1.2% volt transzgenikus, és a megszületett kölykök közül 11.6% volt transzgenikus.

Az alapító egérvonalak Southern-blot-analízise

A „szigetelő”-PCR-rel azonosított 20 transzgenikus alapítót tovább vizsgáltuk Southern-blot-hibridizálással, hogy meghatározzuk: A melyik volt pozitív mindhárom ... (35, 63, 73, 81, 86, 92, 120, 169) gyengén mozaikos. Ezek egyértelműen pozitívak voltak a nagyon érzékeny PCR-analízis alapján, azonban nem sikerült egyértelműen pozitív jelet

detektálni a *Southern*-hibridizálás alkalmazásával. Másik hat alapító (5, 76, 121, 128, 131 és 161) világos pozitív jelet adott legalább egy transzgénre, azonban egyértelműen negatív vagy mozaikos volt legalább egy másik transzgénre nézve. Végül 6 alapító (25, 67, 89, 106, 161, 166) mindegyik transzgén legalább egy kópiáját jelző hibridizációs jelet mutatott.

1. táblázat

A béta-kazein-F(ab')₂-enzim-fúziósfehérjére transzgenikus alapítók *Southern*-blot-hibridizációs adatainak összefoglalása. A kópiaszámot ismert mennyiségű, *Eco*-RI-gyel emésztett mikroinjekciós célú fragmenssel kapott jel alapján végzett durva becsléssel határoztuk meg. (N: nem határozható meg *Southern*-analízissel)

Alapító	LC-transzgén becsült kópiaszám	141-transzgén becsült kópiaszám	213-transzgén becsült kópiaszám
5	2	N	2-3
25	4	4	2
35	N	N	N
63	N	N	N
67	2-3	2-3	3
73	N	N	<1
76	N	1-2	1
81	N	N	N
86	N	N	N
89	>10	>10	>10
92	N	N	<1
106	3	2-3	1

120	N	N	N
121	<1	1	1
128	<1	N	<1
131	<1	N	<1
152	2-3	2-3	2-3
161	N	2-3	<1
166	2-3	3	3-5
169	N	N	N

Egervonalak tenyésztése

Az alapítók *Southern*-blot-analízise után 10 vonalat választottunk ki tenyésztésre: 5, 25, 67, 76, 89, 106, 121, 128, 152 és 166. A 2. táblázatban mindegyik vonal esetében a tenyésztési eredményeket; a 3. táblázatban a PCR-pozitív F1-utód *Southern*-blot-analízisét foglaltuk össze. Az analízis alapján a 121-esen kívül mindegyik alapító továbbadta az integrálódott transzgént (transzgéneket) a következő generációnak. Más vonalak (5, 25, 128, lásd a 2. táblázatot) szintén mutatták a csíravonal mozaikos voltát, a transzgénre nézve pozitív utódok alacsony százalékos értékűek. A *Southern*-analízis is azt valószínűsítette, hogy az alapítók közül néhány bizonyos transzgéneket több példányban integrált. Például a 200-as és a 201-es, amelyek a 166-os alapító leszármazottai, az *LC* és *141* transzgének különböző kópiaszámával, és a *213* transzgén azonos kópiaszámával rendelkeztek. Egy lehetséges magyarázat az, hogy a 166-os alapító legalább két integrációs hellyel rendelkezik, két különböző kromoszómán, az egyik csak az *LC* és *141* transzgéneket, a másik mindhárom transzgént tartalmazza. A 200-as

elnevezésű mindkét integrációs helyet örökölte, míg a 201-es csak az egyiket, amely mindhárom gént tartalmazza (más magyarázat is lehetséges). A többszörös integráció *Southern*-blottal történő azonosítása bonyolult, különösen akkor, ha 3 különböző transzgénről van szó. Nagyobb állatok esetében azonban az általunk alkalmazott *FISH* (fluoreszcens in situ hibridizáció) és a kariotipizálás lehetővé teszi a többszörös integrációs szituációk kiszűrését.

Összefoglalva, 2 alapító (5, 76) dupla transzgén-integrációt (*LC* és 213) adott át az utódainak, és 6 vonal (25, 67, 89, 106, 152 és 166) mindhárom transzgént továbbadta a következő generációnak. Egy másik alapító, a 128-as kétszeresen transzgenikus volt az *LC*-re és a 213-ra nézve, és transzgenikus utódja volt (232). Ezt a vonalat nem követtük tovább, mivel a 128-as elnevezésű utód teje nem mutatta a fúziós fehérje jelentős mértékű termelését.

2. táblázat

Transzgenikus alapítók tenyésztési eredményei. Minden utódot a „szigetelő”-PCR alkalmazásával vizsgáltunk

Alapító (nem)	PCR-re nézve pozitív utód/alomszám (csak a nőstényeket vizsgáltuk)	A kiválasztott transzgenikus F1-nőstény
5 (F)	2/10	27, 219
25 (F)	1/7	204
67 (M)	1/3	177
76 (F)	1/6	212
89 (F)	2/5	178, 17
106 (M)	1/5	186
121 (M)	0/5	N
128 (F)	1/8	232
152 (M)	2/4	194, 195
166 (F)	2/6	200, 201

3. táblázat

A béta-kazein-F(ab')₂-enzim-fúziósfehérjére nézve transzgenikus F1 Southern-hibridizációs adatainak összefoglalása. A kópiaszámot ismert mennyiségű, Eco-RI-gyel emésztett mikroinjekciós célú fragmenssel kapott jel alapján végzett durva becsléssel határoztuk meg. (N: nem határozható meg Southern-analízissel)

Alapító szülő	Transzgenik us F1	LC- transzgén kópiaszám	141- transzgén kópiaszám	213- transzgén kópiaszám
5	217, 219	2	0	2
25	204	3	3	3-4
67	177	1	1-2?	1-2?
76	212	2	0	2
89	178, 179	>10	>10	>10
106	186	3	3-4	2-3
152	194, 195	4-5	4	4-5
166	200, 201	1 (200) 3-4 (201)	1 (200) 4 (201)	4-5 (mindkét esetben)

A transzgenikus egerek tejmintáinak vizsgálata

Az egerektől tejmintákat gyűjtöttünk, az alapító és az F1-nőstények esetében is. Nem hígítottuk a tejet PBS-sel, az enzimatikus mérési eljárásra gyakorolt lehetséges zavaró hatás elkerülése céljából. A mintákat a tesztelésig

-20°C-on fagyasztva tároltuk. A mérési eredményeket a 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat

A humanizált antitestfragmens-béta-kazein-enzim-fúziós-fehérjét (F(ab')₂-CPB) expresszáló egerek tején végrehajtott ELISA-mérések és aktivitási mérések összefoglalása
(na: nem alkalmazható)

Alapító (nem; transzgé- nek)	F1 (transzgé- nek)	ELISA-szintek (mg/ml)	Enzimes mérések (mg/ml)
5 (F, LC-213)	217, 219 (LC- 213)	0.092 alacsony	0.025 alacsony
25 (F, LC-213- 141)	204 (LC-213- 141)	1.5* 1.5-2	1.2* 1.5-2
67 (M, LC-213- 141)	177 (LC-213- 141)	na negatív	na negatív
76 (F, LC-213)	212 (LC-213)	negatív negatív	negatív negatív
89 (F, LC-213- 141)	178, 179 (LC- 213-141)	1.5-2 1.5-2	1.5-2 1.5-2
106 (M, LC-213- 141)	186 (LC-213- 141)	na 4-6	na 4-6
128 (F, LC-213)		alacsony	alacsony
152 (M, LC-213- 141)	195 (LC-213- 141)	na 4-6	na 4-6
166 (F, LC-213- 141)	200, 201 (LC- 213-141)	negatív negatív	negatív negatív

*a méréseket a 25, következetesen magasabb értéket adók második tejeléséből gyűjtöttük

A következő konstrukciókat készítettük el: a kecskeeredetű béta-kazein szabályozószekvenciáját összekapcsolva a humanizált CEA-elleni $F(ab')_2$ könnyű- és nehézlánci kódoló régiójával (806.077), módosított, humán eredetű karboxipeptidáz-B-enzimmal, és a CPB (C-terminális leucinnal) prodoménja kódoló régiójával fuzionáltatva. Transzgenikus egérvonalakat állítottunk elő, a CPB-prodomént expresszáló transzgénnel vagy anélkül. Kimutattuk, hogy a mindhárom konstrukcióra nézve transzgenikus egerek alkalmasak az $F(ab')_2$ -CPB-fúziót magas szinteken (4-6 mg/ml-ig) a transzgenikus egerek (4/6 háromszoros transzgenikus vonalak 1 m/ml-nél magasabb szinteken) tejében való termelésére, az elvárt enzimatiszus aktivitással. Úgy látszik azonban, hogy CPB-domén hiánya összefüggésben van az aktív fúziós fehérje alacsony szintű szekréciójával. Ezt az eredményt körültekintően kell mérlegelnünk, mivel csak 3, kétszeresen transzgenikus vonalat vizsgáltunk (2, mindkettő alapító, és F1).

Összefoglalva: humán eredetű, pankreatikus karboxipeptidáz-B-t (HCPB)-változatokat állítottunk elő, amelyek C-terminális glutaminsav és aszparaginsav hidrolízisére specifikusak, humán eredetű gén helyspecifikus mutagenézisével, és *Escherichia coli* periplazmájában expresszáltunk. Az enzim S1'-zsebe bélésében elhelyezkedő aminosavak kicserélésével lehetséges volt a szubsztrát-specifititás megfordítása olyan módon, hogy a variánsok a

normális esetben C-terminális, bázikus aminosavak helyett C-terminális savas aminosavak előtti hidrolízisre képesek. Ezt úgy értük el, hogy megváltoztattuk a 253-as aszparaginsavat az S1' specificitási zseb alján, amely normális esetben a szubsztrát bázikus oldalláncaival lép kölcsönhatásba, lizinnel vagy akár argininnal. Az eredményül kapott enzimek a kívánt, megfordított polaritással rendelkeztek, és az enzimaktivitás jelentős mértékben javult a 251. aminosavat érintő, további mutációval. A (G251T, D253K) HCPB kettős mutáns 100-szor aktívabb volt a hippuril-L-glutaminsav-szubsztráttal (hipp-Glu) szemben, mint az egyszeres, (D253K) JCPB-mutánssal szemben. A további, Ala-248-as cserét tartalmazó tripla mutánsok a hipp-Glu-szubsztráttal szemben jobb aktivitást mutattak, ha a 251. pozícióban Asn volt. A humán eredetű, fordított polaritású mutáns enzim potenciálisan azt lehetőséget kínálja, hogy alkalmazzuk antitest által irányított, enzimprodrogot alkalmazó rákterápiában.

2. példa

transzferrinreceptor-elleni antitest - angiogenin fúziós fehérje létrehozása és tesztelése

Ez a példa transzferrinreceptor-elleni antitest - angiogenin fúziós fehérjének transzgenikus egér emlőmirigyében történő expresszióját mutatja be. A humán eredetű transzferrinreceptor (E6) elleni kiméra egér/humán eredetű antitestet a CH2-doménján keresztül fuzionáltattuk a humán eredetű angiogenikus ribonukleázzal, az angiogeninnel

(Ang). Egér emlőmirigyében expresszáltuk, és az egértejbe szekretálódott. A tejben expressziós szintje megközelítőleg 0.8 g/l volt. A kimérafehérje megtartotta antitestkötő aktivitását és fehérjeszintézist gátló aktivitását, a szabad angiogeninnel azonos módon. Specifikusan a humán eredetű tumorsejtekhez való specificitással rendelkezett *in vivo*.

Anyagok és módszerek

Transzgenikus egerek

A transzgenikus egereket standard, közzétett eljárások (Roberts és mtsai., 1992; DiTullio és mtsai., 1992; Gutierrez és mtsai., 1996). Alapítóegereket tenyésztettünk tejelő nőstények előállítására céljából, és a tejet összegyűjtöttük, és azonos térfogatú, foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldattal hígítottuk, a korábban leírtak szerint. A tejet -70°C-on tároltuk.

Tejfrakcionálás

Az E6-Ig-antitestet tartalmazó tejet Protein-A-Sepharose-oszlopra vittük, és 0.1 M glicinnel (pH 3) eluáltuk, 1 M Tris-t tartalmazó csövekbe, abból a célból, hogy a pH-t semlegesre állítsuk. A fúziós fehérjét (Ch2Ang) tartalmazó tejben 0.2 M EDTA-koncentrációt állítottunk be és jégen inkubáltuk 20 percig, majd centrifugáltuk 10 percig, 4°C-on Eppendorf-centrifugában. A fölözött tejet óvatosan elválasztottuk a zsírrétegtől, és újra centrifugáltuk, majd *size exclusion high performance liquid chromatography*-nek („nagy hatékonyságú méretkizárási kromatográfia”) vetettük alá TSK-3000 oszlopon (Toso Haas Corp., PA), amelyet 0.1 M foszfátpufferrel (pH 7.4) egyensúlyoztunk ki, és

ezzel is eluáltunk. Az áramlási sebesség 0.5 ml/perc volt, és 1 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. Az angiogenin elleni antitesttel reagáló anyag nagyobb része az oszlop mozgó fázis által átjárható („Void” V_0) térfogatánál eluálódott. Ezt az anyagot összegyűjtöttük és argininport adtunk hozzá 1 M-os végkoncentrációig. Egy éjszakán át inkubáltuk 4°C-on, és a mintákat a TSK-3000-oszlopon újabb kromatográfiának vetettük alá, a fent leírtak szerint. A CH2Ang-ot tartalmazó tej esetében újabb, 1M-os arginines kezelés és a méretkizárási oszlopon újabb kromatográfia volt szükséges.

Fehérjetartalom-meghatározás

A fehérjetartalmat a következő extinkciós koefficiensek alkalmazásával határoztuk meg: E6-IgG-antitest: $E1\%/280\text{nm}=14.0$; CH2Ang: $E1\%/280\text{nm}=10.0$.

Fehérjeszintézis-mérési eljárások

A sejteket 96-üregű mikrotiter-lemezekre helyeztük 10% magzati borjúsérumot tartalmazó Dulbeco-féle esszenciális minimál-tápközegekben. 10 μl teljes térfogatra kiegészítettük, és a lemezeket 37°C-on 3 napig inkubáltuk, majd 0.1 mCi [^{14}C]-leucint adtunk 2-4 óra időtartamra. A sejteket üvegszálal szűrőn gyűjtöttük össze PHD-sejtgyűjtő alkalmazásával, vízzel mostuk, majd etanollal szárítottuk, és a sejtszámot meghatároztuk. Az eredményeket a vakpróbával (kontrollként szolgáló, nem génkezelt próba, „mock”) üregekben mért [^{14}C]-leucin-beépülés %-ában fejeztük ki.

3. példa

Humán eredetű transzferrinreceptor-elleni antitest és antitest-angiogenin-fúziósfehérje expressziója transzgenikus egerek tejében

A transzgenikus egerek előállításában alkalmazott DNS-konstrukciókat az 1. és 2A. ábrákon mutatjuk be. A leírt vizsgálatokban alkalmazott, kiméra, transzferrinreceptor-elleni antitest eredetileg humán eredetű tumornekrózis-faktorról (Hoogenboom és mtsai., 1991), és ezután humán eredetű ribonukleázzal, angiogeninnel (Ang, Rybak és mtsai., 1992) volt fuzionáltatva. Az Ang-gént az antitest CH₂-doménja 5'-régiójának első három aminosava mögé fuzionáltattuk, így a csuklórégiót érintetlenül hagytuk, és a nehézlánc dimerizációja lehetséges (marad). Célunk volt humanizált immuntoxin-szerű fehérjék létrehozása, amelyek a betegeknél kevésbé immunogén mellékhatásokat vált ki. Az *in vivo* emlőseredetű sejtexpressziós rendszer nagyon kevés anyagot eredményezett a funkcionális vizsgálatok szerint különösen akkor, ha az antitest humán eredetű RN-ázzal, azaz angiogeninnel (Ang) volt fuzionáltatva, amely az RN-áz-A szupercsalád tagja. A szupercsalád minden tagja kis méretű (12-14 kDa), bázikus ribo-nukleolitikus enzim, amely a pankréaszban éppúgy megtalálható, mint az emlősök és kételtűek más szerveiben. Ezek az RN-ázok képesek az RNS-t hasítani fiziológiai működés, például angiogenezis kiváltása során, azonban *host defense* (a „saját” védelme) működést, és antivirális hatást is leírtak különböző RN-ázok esetében. Mivel az RN-ázok a természetes védelmi rend-

szer részei lehetnek, alkalmazzák ezeket antitestek széles választékával alkotott, rekombináns fúziós fehérjék és kémiai konjugátumok előállítására. Mivel ezek a vizsgálatok azt jelzik, hogy az RN-áz alapú terápia magában rejti rák és AIDS kezelésének lehetőségét, az eredeti, RN-áz-működést, a humán eredetű, transzferrinreceptor elleni kiméraantitestekkel kifejtett hatását újra megvizsgáltuk, a komplex fehérjék termelésére szolgáló, újonnan kifejlesztett, transzgenikus állat tejében történő termeléssel. A genetikai konstrukció molekuláris részleteit a fentiekben mutattuk be. A római számok a 2A-ábrán bemutatottaknak felelnek meg, és a kecskeeredetű béta-kazein-gén 2. és 7. exonja közé klónozott DNS-ekre is vonatkoznak.

A humán eredetű transzferrinreceptor elleni kiméra-antiest, az E6-antitest teljes nehézláncát kódoló DNS-t alkalmaztuk a módosított, kecskeeredetű β -kazein-gén 2. és 7. exonja közé illesztve (2a. ábra, I), amely magas szinteken expresszáldott transzgenikus, tejelő egér tejében (Roberts és mtsai., 1992). Egy másik, antitest-enzim-fúziósfehérjét kódoló transzgént állítottunk elő úgy, hogy a humán eredetű RN-áz, az angiogenin (Ang) génjét az antitest CH₂-doménjához kapcsoltuk (1. és 2a-ábrák, II). Ezeket a géneket, valamint ugyanannak az antitestnek a könnyűláncát kódoló gént (2a. ábra, III) mind külön klónoztuk, és a megfelelő párokat (nehézláncok, H és könnyűláncok, L; CH₂Ang és L-lánc) tisztítással elválasztottuk az eukariotikus DNS-től, és ko-injektálással egérembriókba juttattuk, amelyeket standard eljárások alkalmazásával visszaültettünk (Roberts

és mtsai., 1992). A transzgenikus egereket az eredményül kapott leszármazottak farokrészből származó DNS PCR-rel és Southern-blottal történő vizsgálatával azonosítottuk.

Alapítóegereket tenyésztettünk tejelő, transzgenikus nőtények előállítása céljából. A tejet összegyűjtöttük, PBS-sel hígítottuk, antitestlánc és Ang jelenlétére vizsgáltuk. A humán eredetű Ang ellen termeltetett poliklonális antitestek a fúziós fehérjében (2. ábra, baloldali rész) csak a várt molekulatömegű (43 kDa; antitest-nehézlánc, 29 kDa; Ang, 14 kDa) sávval reagáltak. Az IgG-elleni antiszérumok azonban az E6-os elnevezésű kiméraantitest H- és L-láncai közül mindkettővel erős reakciót mutattak (2B. ábra, jobboldali rész). Míg az antitest-fúziósfehérje L-láncát világosan kimutatható volt az IgG-elleni antiszérumokkal, a CH2Ang rövidített H-lánca alig volt detektálható, azt jelezve, hogy az angiogenin CH2-doménhoz történő fuzionáltatása gátolta az antiszérumok H-lánchoz történő kötődését.

A kiméra IgG-antitestet *Protein-A-Sepharose*-n történő kromatográfiával tisztítottuk. A 2C. ábrán bemutatottak szerint, az 1. és 2. sávban a végső tisztításon átesett termék redukáló körülmények között történő gélelektroforézise könnyűlánc- (28 kDa) és nehézláncfehérjék (megközelítőleg 55 kDa) jelenlétét mutatták. A nem redukáló körülmények közötti *Western*-analízis (2C. ábra, 3. sáv) azt bizonyította, hogy a transzgenikus antitest IgG- és Fab-formák keverékeként (168 és 84 kDa) van jelen. Kis mennyiségű nehézlánc (55 kDa) is látható volt.

A CH2Ang-ot tartalmazó tejet a fentiekhez hasonló módon gyűjtöttük össze és PBS-sel hígítottuk. A *Protein-A-Sepharose* nem kötötte meg az angiogenin-fúziósfehérjét. Ezzel analóg eredményeket értek el akkor, amikor ugyanazt a CH2-antitestfragmenst korábban TNF-fel fuzionáltatták, és azt valószínűsítették, hogy ez annak tulajdonítható, hogy a feltehetően a CH2-CH3-csatlakozás közelében található *Protein-A*-kötőhelyet deletálták (Hoogenboom és mtsai., 1991). A transzgenikus antitest-Ang-fúziósfehérje természetét *Western*-blotolással határoztuk meg. A láncközi diszulfidhidak redukciója után a H-lánc-Ang-fúzió (43 kDa) és a könnyűlánc (28 kDa) disszociált (2C. ábra, 2. sáv). Nem redukáló körülmények között, IgG-elleni antitesttel történő *Western*-analízis (2C. ábra, 5. sáv) azt mutatta ki, hogy a transzgenikus antitest-enzim-fúziósfehérje F(ab)₂- és Fab-formákként vannak jelen (142 és 71 kDa). Ezzel azonos eredményeket kaptunk akkor, amikor az analízist Ang-elleni antiszérumokkal végeztük el (az eredményeket nem mutatjuk be). Összefoglalva az utóbbi eredmények azt bizonyítják, hogy a könnyűlánc a nehézlánc-Ang-fúzióval asszociál.

4. példa

Antitest-angiogenin-fúziósfehérje biológiai jellemzése

Az angiogenin a nyúl eredetű retikulocita-lizátum transzlációs kapacitásának hatásos gátlószere, amely az angiogenin ribonukleolitikus aktivitásától függő mechanizmuson alapul (St. Clair és mtsai., 1987). A 2. ábra bemu-

tatja, hogy a lizátumhoz Ang vagy CH2Ang hozzáadása a fehérjeszintézis gátlását okozta, amelyet a [^{35}S]-metioninnak savval kicsapható fehérjefázisba történő beépülésével mértünk. A nem fuzionált Ang vagy CH2Ang esetében kapott $\text{IC}_{50}^{\text{S}}$ -érték (40 nM) azonos volt ebben a mérési eljárásában, ami azt jelzi, hogy az aktívhely-aminosavak konformációjára nem volt hatással az Ang CH2-antitestdoménhez ilyen konformációban történő (NH_2 -terminális) fúziója.

A fúziós fehérje antitestrészt kompetíciós kötési kísérletekkel jellemeztük (5. táblázat). A tejből származó E6-antitest (IgG) humán eredetű transzferrinreceptorhoz való kötődését összehasonlítottuk az eredetileg hibridómas sejtekből tisztított, azonos antitest kötésével (Heyligen és mtsai., 1985). Azonos volt a két antitest képessége arra, hogy a [^{125}I]-jelölt parentális antitestet leszorítsa (mindkét antitest esetében az 50%-os leszorítás 0.8 nM). A CH2Ang fúziós fehérje 175-ször kevésbé volt aktív, mint az intakt E6-antitest (140 nM CH2Ang, 0.8 nM E6).

Az Ang-fúziósfehérje humán eredetű tumorsejtekre gyakorolt citotoxikus hatásait az újonnan szintetizált [^{14}C]-leucin-beépülés mérésével határoztuk meg. A tipikus dózis-hatás-görbéket a 3. ábrán tüntettük fel. A CH2Ang gátolta az *SFS39* elnevezésű, humán eredetű gliómasejtek és az *MDA-MB-231^{mdr1}*-mellráksejtek fehérjeszintézisét 15 nM-os (gliómasejtek) és 45 nM-os (mellráksejtek) $\text{IC}_{50}^{\text{S}}$ -értékkel. A más, humán eredetű tumorsejtvonalakra gyakorolt citotoxicitást a II. táblázatban foglaltuk össze. Az $\text{IC}_{50}^{\text{S}}$ -érték 15-7nM között változott. A citotoxicitás a fúziós fehérjére

specifikus volt, mivel nem figyeltünk meg aktivitást anti-génre nézve negatív sejtvonalak esetében (egéreredetű *NIH3T3*-sejtek, az adatokat nem mutatjuk be), és a nem fuzionált kiméraantitest ötszörös moláris feleslege a citotoxicitást megközelítőleg 50%-ban viasszaszorította. Mivel a nem fuzionált antitest sem (Rybak és mtsai., 1992) és a szabad Ang sem (Newton és mtsai., 1996) volt citotoxikus, a citotoxikus hatás kiváltásához az szükséges, hogy a fúziós fehérjében a két domén kovalens módon legyen kapcsolva

Angiogenint izoláltak tumorsejtek kondicionált tápközegéből, és az angiogén aktivitást csirkeembrió-eredetű korioallantois-membránt és nyúl eredetű cornea-t alkalmazó mérési eljárásokkal vizsgálták (Fett és mtsai., 1985). A ribonukleázal mutatott homológiája és jellegzetes, angiogenikus aktivitással összekapcsolt nukleolitikus aktivitása (Shapiro és mtsai., 1986) egyedi biológiai tulajdonságokat eredményez, amely megnövelt tumorsejt-pusztítást segíthet elő, amikor az Ang-ot sejtspecifikus célba juttató hatóanyagokkal juttatjuk célba. Az angiogenikus aktivitás fennmaradt, amikor az Ang-ot fúziós fehérjeként expresszálták (Newton és mtsai., 1996). Az angiogenin sejtfelszíni proteoglikánokhoz is kötődik humán eredetű vastagbél-karcinómasejteken (Soncin és mtsai., 1994). Ennek megfelelően a tumorsejtek antitest általi lokalizálása megnövelheti az Ang tumorsejttőlő képességét, míg a megnövelt mértékű angiogenezis elképzelhető módon elősegítheti a tumorpenetrációt a tumor vaszkularizációja megnövelésével (Piccoli és mtsai., 1998; Olson és mtsai., 1995). Így az Ang hatása pleiotróp; megnyilvánulásait a

Ang hatása pleiotróp; megnyilvánulásait a sejt környezete határozza meg, amelynek az Ang is ki van téve, például a citoszólban elhelyezkedő fehérjeszintetizáló rendszer megcélzása citotoxicitást okoz (Moroiu és Riordan, 1994). Az Ang ilyen biológiai tulajdonságai egyedi lehetőségeket nyújt arra, hogy e fehérje specifikus antagonizálásával vagy célba juttatásával olyan terápiás stratégiát tervezünk, amely citosztatikus (antiangiogenikus) és citotoxikus (tumorsejt-elleni) is egyszerre.

A humán rákterápiában (Rybak és mtsai., 1991; Rybak és mtsai., 1992; Newton és mtsai., 1992; Newton és mtsai., 1994; Newton és mtsai., 1996; Jinno és mtsai., 1996; Zewe és mtsai., 1997; Deonarain és Epnetos, 1998) és a kardiovaszkuláris betegség terápiájában (Haber, 1994; Collen, 1997) az enzimalapú, sokdoménes, célba juttatással ható terápiás eljárások elismerése olyan expressziós rendszerek kifejlesztésétől függ, amelyek alkalmasak e reagensek preklinikai jellemzése és végső klinikai alkalmazása céljából történő előállítására. Kétláncúantitest-Ang-fúziós-fehérje transzgenikus állat tejében történő expresszióját hajtottuk végre és mutattuk be a szabadalmi leírásban. Nem volt nyilvánvaló az, hogy az Ang sikeresen expresszálható fúziós fehérjeként transzgenikus egérben, mivel hasonló fúziós fehérje csak nagyon alacsony szinten expresszálódott a tenyésztett mielómasejtek esetében, feltehetően a szekréció során végbemenő retrográd transzport miatt, amely alacsony termelésű termelők szelekciójához vezetett (Rybak és mtsai., 1992). Rendkívüli módon az emlőmirigy természetes

környezetében az expresszió a sejttenyészet-rendszerhez viszonyítva 160 000-szeresére nőtt (0.8 g/l a tejben, és 5 µg/l a mielómasejtekben). Így lehetséges volt a biológiai jellemzés céljaira elegendő mennyiségű Ang-fúziósfehérje tisztítása. A munka egyik következménye az volt, hogy első alkalommal bizonyítottuk a fúziós fehérjében az Ang orientációjának fontosságát. Az egyláncúantitest-Ang-fúziósfehérjékben az Ang-ot C-terminális részénél fogva fuzionáltatták az antitest N-terminálisához (Newton és mtsai., 1996). Ennek következtében ismertté vált az, hogy az Ang C-terminálisa utolsó három aminosava részt vesz aktívközpont-alhely kialakításában (Russo és mtsai., 1996). Míg az Ang a CH2-fúziósfehérjében és a szabad Ang esetében azonos hatásosságú a nyúl eredetű lizátumon végzett mérési eljárásban, az Ang egyláncú antitesttel alkotott fúziós fehérjében kétszer kevésbé hatásos a szabad Ang-nál a lizátum-mérési eljárás fehérjeszintézise gátlásában. (Newton és mtsai., 1996).

Általánosságban először bizonyítjuk azt, hogy anti-gén-antitest-fúziósfehérje magas szinten expresszálható emlőmirigyben. Közelebbről, azt bizonyítjuk, hogy az antitest-Ang-fúziósfehérje emlőmirigyben való expresszálhatósága nagy jelentőségű a mellrák transzgenikus egérmódeljének kifejlesztése szempontjából. Más, tejspecifikus gének promótereit alkalmazták arra, hogy tejelés időszaka alatt a transzgenek expressziójával neopláziát imitáljanak (Amundadottier és mtsai., 1996). Mivel vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy tejspecifikus promóter aktív immun-

toxin expresszióját indukálhatja, duplán transzgenikus törzseket fejleszthetünk ki annak tesztelésére, hogy a kiválasztott neoplázia ellen irányított Ang-fúziósfehérje megelőzheti-e vagy megváltoztathatja-e a betegség előrehaladását. Ezek az eredmények különösen az Ang esetében relevánsak, mivel az egéreredetű Ang rendelkezésre áll (Bond és mtsai., 1993).

Összefoglalva ezek az eredmények először bizonyítják azt, hogy komplex, heterológ fúziós fehérjék expresszálhatók egér emlőmirigyében nagyobb mennyiségekben és az emlőseredetű sejtkultúrában expresszált fehérjéknél (Rybak és mtsai., 1992) és *E. coli*-eredetű expressziós rendszereknél jobb biológiai tulajdonságokkal. Az eredmények nagy hatást gyakoroltak annak lehetőségére, hogy ezeket a fúziós fehérjéket terápiás szerként termeljük, valamint arra, hogy mellrák új állatmodelljét megalkossuk.

A következő rövidítésekkel alkalmazzuk: Ang: humán eredetű angiogenin; E6: transzferrinreceptor-elleni IgG-jellegű monoklonális antitest; RN-áz: ribonukleáz; H-lánc: nehézlánc; L-lánc: könnyűlánc; CH2Ang: az E6 nehézlánc CH2-doménjával fuzionált angiogenin; IC₅₀: a fúziós fehérje olyan koncentrációja, amely 50%-os gátlást okoz.

5. táblázat

Az E6 és Ang-fúziósfehérje kötése humán eredetű
transzferrinreceptorhoz

Konstrukció	Forrás	Kötés	Különbség (szorzófaktor) EC ₅₀ (nM)
E6	hibridóma	0.8	1
E6	tej	0.8	1
CH2Ang	tej	140	175

II. táblázat: a CH2Ang citotoxicitása

Sejtvonal	CH2Ang IC ₅₀ (nM)
As539	15
HS578T	70
MDA0MB-23 ^[mdr]	45
MALME	40
ACHN	30

7. példa

transzgenikus kecskék általános jellemzése

Az alábbi részek transzgenikus kecskék előállításának főbb lépéseinek rövid leírása

Kecskefajok és fajták

Transzgenikus kecskék előállításakor előnyösek a svájci eredetű kecskék, például *Alpine*, *Saanen* és *Toggenburg* fajták.

Kecske-szuperovuláció:

A donorok nemi ciklusának időzítését a 0. napon 6 mg szubkután módon alkalmazott *norgestomet*-fülimplantátum (*syncromate-B*, *CEVA Laboratories, Inc.*, Overland Park, KS) beadásával történő szinkronizálással valósítottuk meg. Proszttaglandint adtunk be az első 7-9 nap után, az endogén progeszteron-szintézis leállítása céljából. Az implantátum behelyezése utáni 13. napon kezdve, összesen 18 mg follikulus-stimuláló hormont (*FSH-Schering Corp.*, Kenilworth, NK) adtunk be intramuszkulárisan három napon át, napi két injekcióban. Az implantátumot a 14. napon távolítottuk el. Az implantátum eltávolítása után 24 órával a donorállatokat nemzőképes hímekkel fedeztettük néhány alkalommal két napon át [Selgrath és mtsai., *Theriogenology*, 1195-1205 (1990)].

Embriógyűjtés

Az embriógyűjtést szolgáló sebészeti beavatkozást a pároztatás utáni második napon (vagy 72 órával az implantátum eltávolítása után) végeztük el. A szuperovulácónak kitett nőstényektől 36 órával a sebészeti be-

avatkozás előtt az ételt és az italt megvontuk. A nőstényeknek 0.8 mg/kg *Diazepam*-ot (*Valium*®), IV, majd azonnal 5.0 mg/kg *Ketamin*-t (*Keteset*), IV, *Halothane*-t (2.5%) adtunk be a sebészeti beavatkozás alatt 2 l/perc oxigénben, endotrachealis csőben. A reprodukzív szerveket exteriorizáltuk középvonali laparotomiás bemetszéssel. A *corpora lutea*-t, a meg nem repedt, 6 mm-nél nagyobb follikulusokat és az *ovarium* cisztáit megszámláltuk a superovulációs eredmények becslése céljából és az *oviductum*-ból mosással eltávolítandó embriók számának jóslása céljából. Kanült helyeztünk az *oviductum* nyílásába, és ott tartottuk ideiglenes 0.3-as *Prolene* érlekötéssel. 20-as méretű tűt helyeztünk a méhbe a méh-méhkürt elágazástól kb. 0.5 cm-re. 10-20 ml steril, foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldatot (PBS) áramoltattunk a kanüllel ellátott *oviductum*-on át és *Petri*-csészékben összegyűjtöttük. Az eljárást megismételtük az ellenkező oldalon és azután a reprodukzív szerveket visszahelyeztük a hasüregbe. A lezárás előtt 10-20 ml steril, sós glicerinoldatot öntöttünk a hasüregbe az adhézió megelőzése céljából. A *linea alba*-t egyszerű, megszakított *Polydioxanone-2.0* vagy *Supramid* öltésekkel lezártuk és a bőrt steril sebkapcsokkal lezártuk.

A megtermékenyített, kecskeeredetű petesejteket *oviduct* PBS-öblítőfolyadékból összegyűjtöttük sztereomikroszkóp alatt, és 10% magzati borjúsérumot (FBS, *Sigma*) tartalmazó *Ham*-féle tápközegben (*Sigma*, St. Louis, MO) mostuk. Azokban az esetekben, ahol a pronukleusz látható volt, az embriókat azonnal mikroinjekciónak vetettük alá. Ahol a

pronukleusz nem volt látható, az embriókat 10% magzati borjúsérumot tartalmazó *Ham*-féle tápközegekben rövid idejű tenyészetbe vihettük 37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó levegőt tartalmazó, párásított gázkamrában, míg a pronukleuszok láthatóvá válnak [Selgrath és mtsai., *Theriogenology*, 1195-1205 (1990)].

Mikroinjektálási eljárás

Egysejtű kecskeembriókat helyeztünk olaj alatt tápközegek-mikrocseppbe, süllyesztett („*depression*”) tárgylemezre. Két látható pronukleusszal rendelkező, megtermékenyített petesejteket helyeztünk lánggal simított („*flame polished*”) tartó mikropipettára Zeiss márkájú álló, fix állványzatú mikroszkóp alatt Normanski optika alkalmazásával. Pronukleuszt injektáltunk az adott DNS-konstrukcióval, például a kecskeeredetű béta-kazein-gén szabályozóelemeivel működőképesen kapcsolt fúziósfehérje-gént tartalmazó Bc355-vektorral injektálási pufferben (Tris-EDTA) *fine* üveg mikrotű alkalmazásával [Selgrath és mtsai., 1195-1205 (1990)].

Embriófejlesztés

A mikroinjekció végrehajtása után az életben maradt embriókat 10% magzati borjúsérumot tartalmazó *Ham*-féle tápközegekben 37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó levegőt tartalmazó, párásított gázkamrában tenyészetbe helyeztük [Selgrath és mtsai., *Theriogenology*, 1195-1205 (1990)].

A recipiensek előkészítése

A recipiens állatokban a nemi ciklus szinkronizálását 6 mg *norgestomet*-fülimplantátummal (*Syncromate-B*) indukál-

tuk. Az implantátum behelyezése utáni 13. napon az állatoknak egyszeri, szuperovulációt nem indukáló, vemhes kancából származó gonadotropin-injekciót (PMSG, 400 I.U., *Sigma*) adtunk be. A recipiens nőtényeket vazektómiának alávetett hímekkel pároztattuk a nemi ciklus szinkronizálása biztosítása céljából [Selgrath és mtsai., *Theriogenology*, 1195-1205 (1990)].

Embriótranszfer

Az egy donortól származó összes embriót együtt tartottuk és egyetlen recipiensbe vittük, ha ez lehetséges volt. A sebészeti beavatkozás az embriógyűjtésnél leírtakkal azonos volt, kivéve azt, hogy az *oviduct*-ba nem helyeztünk kanült, és az embriókat minimális térfogatú, 10% magzati borjúsérumot tartalmazó, *Ham*-féle tápközegben átvittük az *oviduct* üregébe a *fimbria*-n át, üveg anyagú mikropipetta alkalmazásával. Azokat az állatokat, amelyekben több, mint 6-8 ovulációs pont volt az ováriumban, recipiensként való alkalmazásra alkalmatlannak ítéltük. A bemetszés lezárása és az operációt követő gondozás ugyanúgy történt, mint a donorállatok esetében [lásd Selgrath és mtsai., *Theriogenology*, 1195-1205 (1990)].

A vemhesség és az ellés megfigyelése

A vemhességet a nemi ciklus felfüggesztése után 45 nappal határoztuk meg ultrahang alkalmazásával. A 110. napon második ultrahangos vizsgálatot végeztünk el a vemhesség megerősítése és a magzati stressz megállapítása céljából. A 130. napon a vemhes nőtényeket tetanusztoxinnal és *Clostridium C&D*-vel vakcináztuk. Szelént és E-vitamint (Bo-

Se) adtuk intravénásan, és Ivermectin-t szubkután módon. A nőtényeket a 145. napon tiszta istállóállásokban helyeztük el és ehhez a környezethez akklimatizálódni engedték a körülbelül a 147. napon indukálendő ellésig. Az ellést a 147. napon indukáltuk 40 mg PGF2a-val (Lutalyse®, Upjohn Company, Kalamazoo Michigan). Az injekciót intravénásan adtuk be két dózisban, 20 mg-os dózisban, majd 4 óra múlva 20 mg-os dózisban. A 147. napon napközben és este a nőtényeket periodikus megfigyelés alatt tartottuk az első Lutalyse®-injekciót követően. A második napon reggeltől kezdve a megfigyelések gyakoriságát megnöveltük: 30 percenként figyeltük meg az állatokat. Az ellés az első injekció után 30-40 órával következett be. Az ellés után a nőtényeket megfejték a kolosztrum gyűjtése céljából, és a placenta eltávolításáról is megbizonyosodtunk.

Az F₀-állatok transzgenikus természetének ellenőrzése

Transzgenikus F₀-állatok szkrínelésére genomi DNS-t izoláltunk két különböző sejtvonalból abból a célból, hogy ne veszítsünk el mozaikosan transzgenikus állatot. Mozaikosan transzgenikus állatként definiáljuk azokat a kecskéket, amelyek nem rendelkeznek legalább az egyik kópia transzgénnel minden sejtben. Ezért fülszövetmintát (mezoderma) és vérmintát vettünk minden kétnapos F₀-állatból genomi DNS izolálása céljából [Lacy és mtsai., A Laboratory Manual, kiad.: Cold Spring Harbor, NY (1986); és Hermann és Frischauf, Methods Enzymology 152: 180-183 (1987)]. A DNS-mintákat a fúziósfehérje-génre specifikus láncindítókkal, polimeráz-láncreakció alkalmazásával [Gould és mtsai.,

Proc. Natl. Acad. Sci., 86: 1934-1398 (1989)], és *random primed* (random módon indított) elsőtag- vagy másodikttag-cDNS-próba alkalmazásával, *Southern-blot*-analízissel [Feinberg és Vogelstein, Anal. Bioc. 132: 6-13 (1983)] vizsgáltuk. A mérési eljárás becslés szerint egy kópia transzgén detektálása a szomatikus sejtek 10%-ában.

A termelőnyáj kifejlesztése és szelekciója

A fent leírt eljárások alkalmazhatóak transzgenikus alapítókecskék (F_0), valamint más, transzgenikus állatok előállítására. A transzgenikus F_0 -alapítókecskékek tenyésztjük például: a nőtényeket tejtermelés céljából, vagy a bakokat transzgenikus nőtényutódok előállítása céljából. A transzgenikus alapítóbakot pároztathatjuk nem transzgenikus nőtényekkel transzgenikus nőtény utód létrehozása céljából.

A transzgén átvitele és tulajdonságai

Az adott transzgénnek a kecskevonalon történő átvitelét fülszövetben és vérben vizsgáltuk PCR-rel és *Southern-blot*-analízissel. Például az alapító bak és a három transzgenikus utód *Southern-blot*-analízise azt mutatja, hogy a generációk között nem történt átrendeződés vagy a kópiaszám változása. A *Southern-blot*okat az immunglobulin-enzim-fúziósfehérje cDNS-próbájával vizsgáltuk. A blotokat *Betascope-603*-mal vizsgáltuk és a kópiaszámot meghatároztuk úgy, hogy a transzgént a kecskeeredetű endogén béta-kazein-génnel összehasonlítottuk.

Az expressziós szint becslése

A transzgenikus fehérje expressziós szintjét a transzgenikus állatok tejében enzimatis mérési eljárásokkal vagy *Western-blotok* alkalmazásával határoztuk meg.

Az idézett hivatkozások kiegészítő listája

Maniatis T., Frisch, E.F. és Sambrook, J.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, New York, USA)

Amudadottir, L.T., Merlino és Dickson, R.B., „Transgenic mouse models of breast cancer, *Breast Can. Res. and Treatment* 39: 119 (1996).

Bond, M.D., Strydom, D.J. és Vallee, B.L., „Characterization and sequencing of rabbit, pig and mouse angiogenins; Discemment of functionally important residues and regions.” *Biocems Biophys Acta* 1162.177 (1993).

Bosslet, K., Dzech, J., Lorenz, P., Sedlacek, H.H., Schuermann, M. és Seemann, G., „Molecular and functional Characterization of a fusion protein suited for timre specific prodrug activation.” *Br. J. Cancer* 65: 234 (1992).

Castilla, J., Pintado, B., Sola, I., Sanchez-Morgado, J.M. és Enjuades, L., „Engineering passive immunity in transgenic mice secreting virus-neutralizing antibodies in milk.” *Nature Biotechnology* 16: 349 (1998).

Clark, A., „Gene expression in the mammary glands of transgenic animals.” *Biochem Soc. Symp.* 63: 133 (1997).

Collen, D., „Thrombolytic Therapy”, *Thrombosis and Haemostasis* 78: 742 (1997).

Colman, A., „Production of proteins in the milk of transgenic livestock; problems, solutions and success.” Am. J. Clin. Nutr. 63: 639S (1996).

Deonarain, M.P. és Epenetos, A.A., Design, Characterization and antitumor cytotoxicity of a panel of recombinant, mammalian ribonuclease-based immunotoxins.” Br. J. Cancer 77: 537 (1998).

DiTullio, P., Cheng, S.H., Marshall, J., Gregory, R.J., Ebert, K.M., Meade, H.M. és Smith, A.E., „Production of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the milk of transgenic mice.” Bio/Technology 10: 74 (1992).

Fett, J.W., Strydom, D.J., Lobb, R.R., Alderman, A.M., Bethune, J.L., Riordan, J.F. és Vallee, B.L. „Isolation and characterization of angiogenin angiogenic protein from human carcinoma cells.” Biochemistry 24: 5480 (1985).

Goshorn, S.C., Svensson, H.P., Kerr, D.E., Somerville, J.E., Senter, P.D. és Fell, H.P., „Genetic construction, expression and characterization of a single chain anti-carcinoma antibody fused to B-lactamase, Cancer Res. 53: 2123 (1993).

Gutierrez, A., Meade, H.M., DiTuillio, P., Pollock, D., Harvey, M., Jimenez-Flores, R., Anderson, G., Murraz, J. és Medrano, J., „Expression of a bovine kappa CN cDNA in the mammary gland of transgenic mice utilizing a genomic milk protein gene as an expression cassette.” Transgenic Res. 5: 271 (1996).

Haber, E., „Antibody-plasminogen activator conjugates and recombinant proteins." Methods in Mol. Genet. 5: 111(1994).

Heyligen, H., Thijs, C., Weber, W., Bosmans, E. és Raus, J. „Monoclonal antibodies detecting human T cell activation antigens; development of monoclonal antibodies and expression of antigens on activated T cells and leukemic cells." Fed. Proc. 44: 787 (1985).

Hoogenboom, H.R., Raus, J.C.M. és Volckaert, G. „Cloning and expression of a chimeric antibody directed against the human transferrin receptor." J. Immunol. 144:3211 (1990).

Hoogenboom, H.R., Volckaert és G. Raus, J.C.M. „Construction and expression of antibody-tumor necrosis factor fusion proteins." Mol. Immunol. 28: 1027 (1991).

Jinno, H., Ueda, M., Ozawa, S., Kikuchi, K., Ikeda, T., Enomoto, K. és Kitsjima, M. „Epidermal Growth factor receptor dependent cytotoxic effect by an EGF-ribonuclease conjugate on human cancer cell lines: a trial for less imunogenic chimeric toxin." Can. Chemoter. Pharmacol. 38: 3063 (1996).

Limonta, J., Pedraza, A., Rodriquez, A., Grehre, F.M., Barral, A.M., Castro, . F.O., Lleonart, R., Gracia, C.A., Gavilondo, J.V. és DelaFuente, J. „production of an active anti-CD6 mouse/human chimeric antibodies in the milk transgenic mice." Immunotechnology 1: 107 (1995).

Maga, E. és Murray, J., „Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk.” *Bio/Technology* 13: 1452 (1995).

Moroninau, J. és Riordan, J.F., „Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 1677 (1994).

Newton, D.K., Illercil, O., Laske, D.W., Oldfield, E., Rybak, S.M. és Youle, R.J. „Cytotoxic ribonuclease chimeras: Targeted tumoricidal activity *in vivo* and *in vitro*.” *J. Biol. Chem.* 267: 19572 (1992).

Newton, D.L., Nicholls, P.J., Rybak, S.M. és Youl, R.J. „Expression and characterization of recombinant human eosinophyl-derived neurotoxin and eosinophyl-derived neurotoxin-anti-transferrin receptor sFv.” *J. Biol. Chem.* 269: 26739 (1994).

Newton, D.L., Xue, Y., Olson, K.A., Fett, J.W. és Rybak, S.M. „Angiogenin single chain immunofusions; influence of peptide linkers and spacer between fusion proteins domains.” *Biochemistry* 35: 545 (1996).

Olson, K.A., Fett, J.W., Grench, T.C., Key, M.E. és Vallee, B.L. „Angiogenin antagonists prevent tumor growth *in vivo*.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 442 (1995).

Pastan, I. „Targeted therapy of cancer with recombinant immunotoxins.” *Biochim, Biophys. Acta* 1333, Cl. (1997).

Piccoli, R., Olson, K.A., Vallee, B.L. és Fett, J.W. „Cimeric anti-angiogenin antibody cAB 26-2F inhibits the formation of human breast cancer xenografts in a hymic mice.” Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 95: 4579 (1998).

Roberts, B., DiTullio, P., Vitale, J., Hehir, K. és Gordon, K. „Cloning of the goat β casein-encoding gene and expression in transgenic mice.” Gene 121: 255 (1992).

Rodriguez, M.L., Presta, L.G., Kotts, C.E., Wirth, C., Mordenti, J., Isaka, G., Wong, W.L.T., Nuijens, A., Blackburn, B. és Carter, P. „Development of a humanized disulfide stabilized anti-p185 HER2 Rv- β Lactamase fusion protein for activation of a cephalosporin doxorubicin prodrug.” Cancer Res. 55: 63 (1995).

Russo, N., Nobile, V., DiDonato, A., Riordan, J.F. és Valee, B.L. „The C-terminal...” 93: 3243 (1996)

Rybak, S.M., Hoogenboom, H.R., Meade, H.M., Raus, J.C., Schwartz, D. és Youle, R.J. „Humanization of immunotoxins.” Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 3165 (1992).

Rybak, S.M., Newton, D.L. és Xue, Y. „RNase immunofusions for cancer therapy.” Tumor Targeting 1: 141 (1995)

Rybak, S.M., Saxena, S.K., Ackerman, E.J., Youle, R.J. „Cytotoxic potential of ribonuclease and ribonuclease hybrid proteins.” J. Biol. Chem. 266: 21202 (1991).

Schein, C.H. „From housekeeper to microsurgeon: The diagnostic and therapeutic potential of ribonuclease.” Nature Biochemistry 15: 529 (1997).

Shapiro, R., Riordan, J.F. és Vallee, B.L. „Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin.” *Biochemistry* 25: 3527 (1986).

Siemens, N.O., Kerr, D.E., Arnold, S., Stebbins, M.R., Vruthula, V.M., Hellstrom, J., Hellstrom, K.E. és Senter, P.D. „Construction, expression and activities of L49-sFv- β -Lactamase, a single-chain antibody fusion protein for anticancer prodrug activation.” *Bioconjugate Chem.* 8: 510 (1997).

Sola, I., Castilla, J., Pintado, B., Sanchez-Morgando, J.M., Whitelaw, B.A., Clark, A.J. és Enjuanes, L. „Transgenic mice secreting coronavirus neutralizing antibodies into the milk.” *J. Virol.* 72: 3762 (1998).

Soncin, F., Sharpiro, R. és Fett, J.W. „A cell-surface proteoglycan mediates human adenocarcinoma HT-29 cell adhesion to human angiogenin.” *J. Biol. Chem* 269: 8999 (1994).

St. Clair, D.K., Rybak, S.M., Riordan, J.F. és Vallee, B.L. „Angiogenin abolishes cell-free protein synthesis by specific ribonucleolytic inactivation of biosomes.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 8330 (1987).

Strydom, D.J., Fett, J.W., Lobb, R.R., Alderman, E.M., Bethune, J.L., Riordan, J.F. és Vallee, B.L. „Amino acid sequence of human tumor derived angiogenin.” *Biochemistry* 24: 5486 (1985).

Thrust, G.R., Lark, L.R., Clinchy, B.C. és Vietta, E.S. „Immunotoxins: An Update.” *Ann. Rev. Immunol.* 14: 49 (1996).

Youle, R.J., Newton, D.L., Wu, Y.N., Gadina, M. és Rybak, S.M. „Cytotoxic Ribonuclease and Chimeras in Cancer Therapy.” Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10: 1

Zewe, M., Rybak, S.M., Dubel, S., Coy, J.F., Welschhof, M., Newton, D.L. és Little, M. „Cloning and cytotoxicity of human pancreatic Rnase immunofusion. Immunotechnology 3: 127 (1997).

Az alábbi igénypontok egyéb megvalósítási módokat is felölelnek.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás transzgenikus fúziós fehérje előállítására, *azzal jellemezve*, hogy olyan transzgenikus állatot állítunk elő, amely tartalmazza a fúziós fehérje expresszióját biztosító transzgént; ezáltal lehetővé tesszük a transzgén expresszióját, és a fúziós fehérjének a transzgenikus állat tejéből történő kinyerését.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy fúziós fehérjeként immunglobulin-alegységet és enzimet tartalmazó fehérjét állítunk elő.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy fúziós fehérjeként olyan fúziós fehérjét állítunk elő, amely tartalmaz első tagot másodikkal fuzionáltatva, és az első tag tartalmazza célba juttató molekula alegységét és a második tag sejttoxin.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy fúziós fehérjeként olyan fúziós fehérjét állítunk elő, amely tartalmaz tumorantigénre specifikus Ig-alegységet.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy tumorantigénként a carcinoembriotikus antigént (CEA), vagy transzferrinreceptort, vagy TAG-72-t, vagy epidermális növekedési hormon receptorát alkalmazzuk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy fúziós fehérjeként olyan fúziós fehérjét állítunk elő, amely tartalmaz RN-áz.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy RN-ázként RN-áz-A-t tartalmazó fúziós fehérjét állítunk elő.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy fúziós fehérjeként olyan fúziós fehérjét állítunk elő, amely tartalmaz angiogenint.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy fúziós fehérjeként olyan fúziós fehérjét állítunk elő, amely tartalmaz karboxipeptidáz-B-enzimet.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy fúziós fehérjét transzgenikus állat emlőmirigyében állítjuk elő.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy fúziós fehérjét transzgenikus állat tejében szekretálva állítjuk elő, legalább 0.5 mg/ml-es vagy magasabb koncentrációban.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy fúziós fehérjét transzgenikus állat tejében szekretálva állítjuk elő, legalább 1.0 mg/ml-es vagy magasabb koncentrációban.

13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy fúziós fehérjeként olyan fúziós fehérjét állítunk elő, amely immunglobulin-alegységként humanizált antitestet tartalmaz.

14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a transzgenikus fúziós fehérjét kódoló transzgénként olyan transzgént alkalmazunk, amely tartalmaz:

- a) adott esetben szigetelőszekvenciát;
- b) emlőhámuszövet-specifikus promótert;
- c) nukleotidszekvenciát, amely olyan - adott esetben tejspecifikus fehérjéből származó - szignálszekvenciát kódol, amely alkalmas a fúziós fehérje szekréciójának vezérlésére;
- d) adott esetben nukleotid-szekvenciát, amely szekretálódó fehérje, - adott esetben tejbe szekretálódó fehérje - amino-terminális régiójának ahhoz elegendő részét kódolja, amely lehetővé teszi a fúziós fehérje szekrécióját, adott esetben transzgenikus emlősállat tejébe történő szekrécióját;
- e) a fúziós fehérjét kódoló egy vagy több nukleotid-szekvenciát; és
- f) adott esetben emlőseredetű gén 3'-irányú nem transzlálódó régióját.

15. Izolált nukleinsav-konstrukció, amely tartalmaz:

- a) adott esetben szigetelőszekvenciát;
- b) emlőhámuszövet-specifikus promótert;
- c) nukleotidszekvenciát, amely olyan - adott esetben tejspecifikus fehérjéből származó - szignálszekvenciát kódol, amely alkalmas a fúziós fehérje szekréciójának vezérlésére;
- d) adott esetben nukleotid-szekvenciát, amely szekretálódó fehérje - adott esetben tejbe szekretálódó fehérje - amino-terminális régiójának ahhoz elegendő részét kódolja, amely lehetővé teszi a fúziós fehérje szekrécióját,

adott esetben transzgenikus emlősállat tejébe történő szekrécióját;

e) egy vagy több nukleotid-szekvenciát, amely az 1. igénypontban ismertetett fúziósfehérjét kódol; és

f) adott esetben emlős eredetű gén, például emlőhám-specifikus gén (pl. tejfehérjégen) 3'-irányú nem transzlálódó régióját.

16. Gyógyászati vagy táplálék-kiegészítő készítmény, amely tartalmaz hatásos mennyiségű fúziós fehérjét, például az itt ismertetett immunglobulin-enzim-fúziósfehérjét, és gyógyászatilag elfogadott hordozót.

17. A 16. igénypont szerinti készítmény, amely tejet tartalmaz.

18. Transzgenikus állat, amely az 1-13. igénypontok bármelyikében ismertetett fúziós fehérjét kódoló transzgént tartalmaz.

19. A 15. igénypont szerinti transzgenikus állat, amely alkalmas a fúziós fehérje tejében történő szekretálására legalább körülbelül 0.5 mg/ml-es vagy nagyobb koncentrációban.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



Dr. Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivő

103 oldal leírás
4 oldal rajt

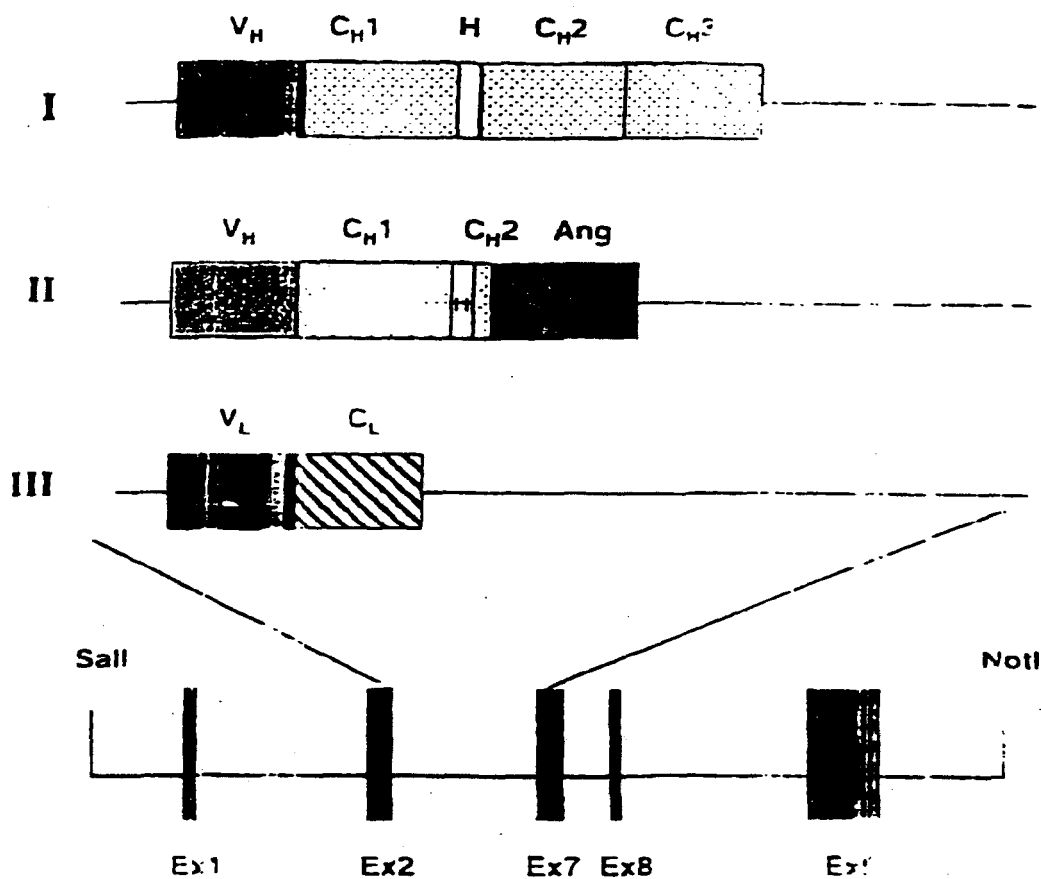
107 oldal

Zoltán Ádám

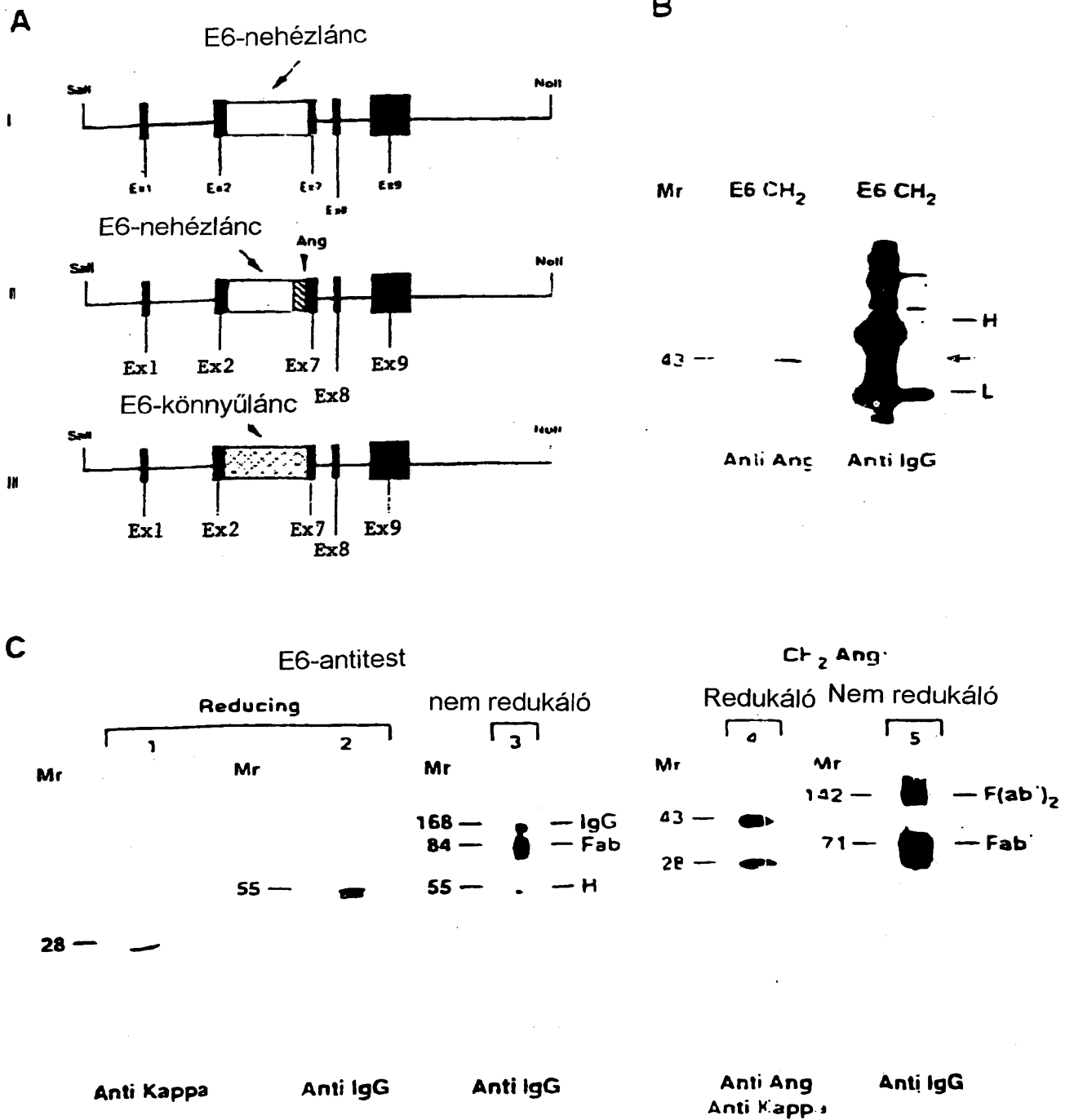
PCT/US00/25560

1/4

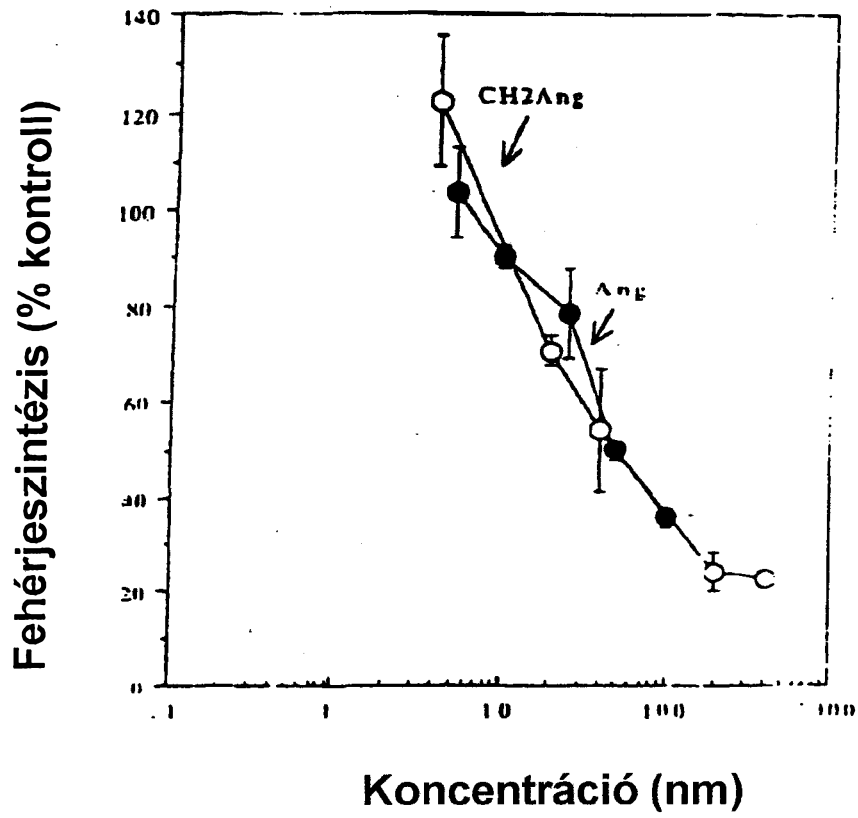
Genetikai antitest- és antitest-Ang-konstrukciók



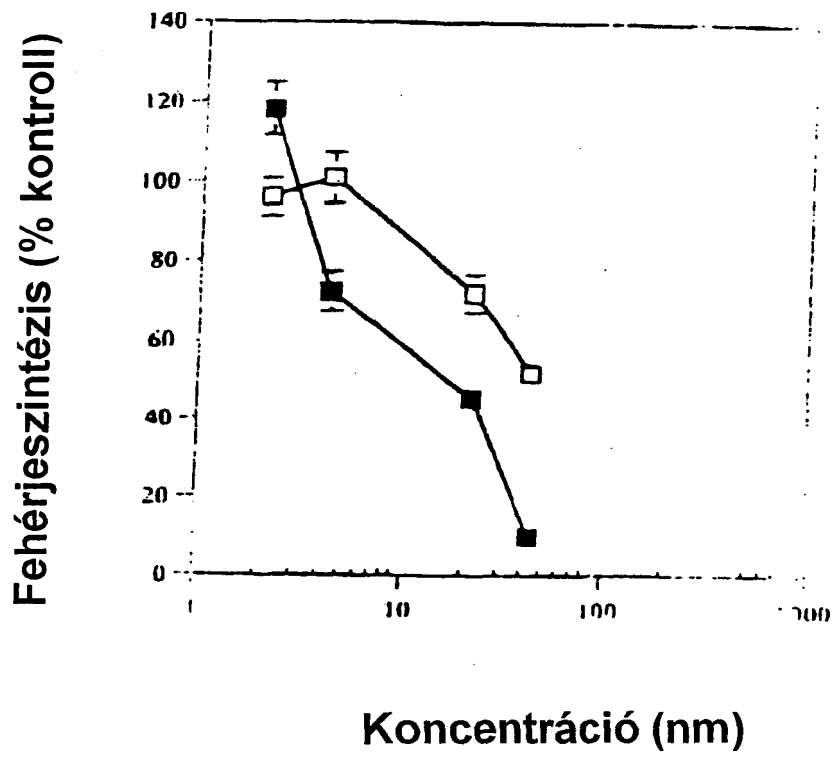
1. ábra



2. ábra



3. ábra



4. ábra