

P02 00366

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



A1

Új vegyületek

K I V O N A T

A találmány tárgyát CASB618-polipeptidek és polinukleotidok, illetve az ilyen polipeptidek rekombináns eljárásokkal történő előállítására szolgáló eljárások képezik. A találmány tárgyát képezik továbbá CASB618-polipeptideken és polinukleotidokon alapuló diagnosztikai eljárások, és rákos megbetegedések - konkrétan petefészek és vastagbél rákos megbetegedéseire, autoimmun betegségek, és hasonló esetek - megelőzésére és terápiás kezelésére szolgáló eljárások.

jellemző ábrák

Th

P02 00366

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



A 1

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

Új vegyületek

A találmány tárgyát polinukleotidok (a továbbiakban CASB618 polinukleotidok), ezek által kódolt polipeptidek (a továbbiakban CASB618 polipeptidek), rekombináns anyag és ezek előállítására szolgáló eljárás képezi. A találmány egy másik szempontja szerint, a találmány tárgyát képezik ilyen polipeptidek és polinukleotidok alkalmazására szolgáló eljárások - ideértve a rákos megbetegedés, konkrétan vastagbélrák és autoimmun betegségek, és hasonló állapotok kezelését. A találmány egy további szempontja szerint a találmány tárgyát olyan eljárások képezik, amelyek a találmány tárgyát képező vegyületek alkalmazásával agonisták és antagonisták/inhibitorok azonosítására, és az azonosított vegyületekkel CASB618-polipeptid egyensúlyhiányával kapcsolatos állapotok kezelésére szolgálnak. A találmány egy további szempontja szerint, a találmány tárgyát a nem megfelelő CASB618-polipeptid-aktivitással vagy szintekkel összefüggésbe hozható betegségek kimutatására szolgáló diagnosztikai eljárások képezik.

Aktaszámunk: 95231-5895/SG

A találmány szerinti polipeptidek és polinukleotidok feltehetően a tumorok elleni specifikus megelőző vagy kezelési vakcinálásban fontos immunogének, miután tumorokban ezek a polipeptidek és polinukleotidok specifikusan expresszálódnak vagy messze túlexpresszálódnak a normális sejtekben tapasztaltakhoz képest. Ennélfogva e polipeptidek és polinukleotidok a tumorsejt pusztulásához vezető antigén-specifikus immunmechanizmusokkal célbavehetők. E polipeptideket és polinukleotidokat tumorsejtek előfordulásának diagnosztizálására is alkalmazni lehet. Továbbá, e polipeptidek és polinukleotidok bizonyos körülmények között bekövetkező nem megfelelő expressziója autoimmunválasz - nem megfelelő immunválasz - indukálását okozhatja, amelyet ugyanezen polipeptidek és polinukleotidok alkalmazásával történő megfelelő vakcinálással korrigálni lehet. sok képezik. A találmány egy másik szempontja szerint, a találmány tárgyát képezik ilyen polipeptidek és polinukleotidok alkalmazására szolgáló eljárások - ideértve a rákos megbetegedés, konkrétan vastagbélrák és autoimmun betegségek, és hasonló állapotok kezelését. A találmány egy további szempontja szerint a találmány tárgyát olyan eljárások képezik, amelyek a találmány tárgyát képező vegyületek alkalmazásával agonisták és antagonisták/inhibitorok azonosítására, és az azonosított vegyületekkel CASB618 polipeptid egyensúlyhiányával kapcsolatos állapotok kezelésre szolgálnak. A találmány egy további szempontja szerint, a találmány tárgyát a nem megfelelő CASB618 polipeptid-aktivitással vagy szintekkel összefüggésbe hozható betegségek kimutatására szol-

gáló diagnosztikai eljárások képezik. Ebben a vonatkozásban a találmány tárgyát képező polipeptid számunkra leginkább megfelelő biológiai tulajdonságai a polipeptid antigénikus és immunogén aktivitása. A találmány tárgyát képező polipeptid mutathatja a CASB618 polipeptid legalább egy másik olyan biológiai aktivitását is, amely miatt e polipeptid - az immunterápiás alkalmazástól eltérő - gyógyászati vagy megelőző beavatkozásokra alkalmas céllá válhat.

A funkcionális genomika jórészt nagy teljesítményű DNS-szekvenálási eljárásokon és sok, mostanában elérhető molekuláris biológiai adatbázisokból a potenciálisan érdekes génszekvenciák azonosítását lehetővé tevő különféle bioinformatikai eszközökön alapul. Konkrét szövettel vagy élettani helyzettel kapcsolatos génekre nézve feldúsított cDNS-könyvtárakat elő lehet állítani a mostanában kifejlesztett szubtraktív klónozó eljárásokkal. Továbbá, csak kizárólag bizonyos szövetekből előállított könyvtárakban megtalálható cDNS-eket megfelelő elektronikus szűrővizsgálati eljárások alkalmazásával azonosítani lehet. Nagyteljesítményű, genomon vagy géneken alapuló biológiai módszerek új megközelítéseket szolgáltatnak olyan célgének azonosítására és klónozására, amelyek alkalmasak bizonyos betegségek - például rák és autoimmunitás - immunválasz kiváltása útján történő megelőzésére vagy vakcinák alkalmazásával végzett kezelésére.

A találmány első szempontja szerint, a találmány tárgyát CASB618 polipeptidek képezik. E peptidek közé tartoznak az olyan izolált polipeptidek, amelyek aminosav-

szekvenciája a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciával, a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia teljes terjedelmére nézve legalább 70%-ban azonosak, előnyösen legalább 80%-ban azonosak, előnyösebben legalább 90%-ban azonosak, még előnyösebben legalább 97%-ban azonosak, legelőnyösebben legalább 97-99%-ban azonosak. E polipeptidek közé tartoznak a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptidek.

A találmány tárgyát képező további peptidek magukban foglalják az olyan izolált polipeptideket, amelyek aminosav-szekvenciája a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciával, a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia teljes terjedelmére nézve legalább 70%-ban azonosak, előnyösen legalább 80%-ban azonosak, előnyösebben legalább 90%-ban azonosak, még előnyösebben legalább 97%-ban azonosak, legelőnyösebben legalább 97-99%-ban azonosak. E polipeptidek közé tartoznak a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polipeptidek.

A találmány tárgyát képező további peptidek közé tartoznak a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvenciát tartalmazó polinukleotid által kódolt, izolált polipeptidek.

A találmány tárgya továbbá a CASB618 polipeptid olyan immunogén fragmentuma, amely a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptid immunogén tulajdonságaival megegyezik, vagy ahhoz

hasonló. Azaz, a fragmentum (amennyiben szükséges vivő- anyaghoz kapcsoltn) képes a CASB618 polipeptidet felismerő immunválaszt kiváltani. Ilyen immunogén fragmentum tartalmazhatja, például, az olyan CASB618 polipeptidet, amelyből az N-terminális leader szekvencia, a transzmembrán domén, vagy a C-terminális horgonydomén („anchor”) hiányzik. A találmány előnyös szempontja szerint a találmány tárgyát képező CASB618 immunogén fragmentum tartalmazza a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciával, a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia teljes terjedelmére nézve legalább 70%-ban azonos, előnyösen legalább 80%-ban azonos, előnyösebben legalább 90%-ban azonos, még előnyösebben legalább 97%-ban azonos, legelőnyösebben legalább 97-99%-ban azonos polipeptidnek lényegében az összes extracelluláris doménjét.

CASB618 valamely epitópját magában foglaló peptidfragmentumok jellemzően tartalmazznak a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvenciából legalább 7, előnyösen 9 vagy 10 egymáshoz kapcsolódó aminosavat. Előnyös epitópokat mutatunk be a szekvencialistában 5-77. azonosítószámon megadott szekvenciákban.

Ezen epitópokat magukban foglaló peptidek képezik a találmány egy előnyös szempontját. A találmány tárgyát képezik továbbá az ezen epitópokkal megegyező jellemzőkkel bíró mimotópok, illetve ilyen mimotópokat tartalmazó, a CASB618 molekulával kapcsolatos valamely epitóppal keresztreakciót adó immunválaszt generáló immunogének is.

A találmány tárgyát képezik tehát ezen epitópokat önmagukban, illetve ezen epitópok bármely mimotópját tartalmazó izolált peptidek. A leírás szerinti értelemben a mimotóp olyan egység, amely lényegét tekintve hasonlít a natív CASB618 epitópjához, így a natív molekulát felismerő antitestek képesek ezeket felismerni [Gheysen, és mtsai, „Synthetic peptides as antigens”, Ciba Foundation Symposium 119, 130-149, kiad.: Wiley, Chicester (1986); Gheysen, Mol. Immunol. 23, 709-715 (1986)]; vagy - alkalmas vivőanyaghoz kapcsoltnan - képesek a natív molekulával keresztreakciót adó antitestek generálását kiváltani.

Konkrét célokból, bizonyos kiválasztott aminosavak addíciójával, deléciójával vagy szubsztitúciójával a fent meghatározott epitópok peptid mimotópjait meg lehet tervezni. Így, a találmány tárgyát képező peptideket proteintermészetű vivőanyaghoz történő konjugáció megkönnyítése céljából módosítani lehet. Például, bizonyos kémiai konjugálási eljárások szempontjából kívánatos lehet az epitópba terminális ciszteint beépíteni. Ezenfelül, proteintermészetű vivőanyaghoz konjugált peptidek esetében kívánatos lehet a peptid konjugált szakaszától távolabb eső hidrofób szakasz beépítése oly módon, hogy a peptid szabad, nem konjugált vége a vivőfehérje felszínével asszociáltan maradjon meg. Ez csökkenti a peptid konformációs szabadságfokát, és így növeli annak valószínűségét, hogy a peptidet olyan konformációban mutassuk be, amely leginkább megközelíti a peptidnek a teljes molekula viszonylatában fennálló konformációját. Például, a peptideket meg lehet változtatni úgy,

hogy az N-terminális végén cisztein legyen és a C-terminálison pedig hidrofób, amidált farok. Esetleg, egy vagy több aminosav D-sztereoizomerje addíciójával vagy szubsztitúciójával hasznos származékot - például megnövelt stabilitású peptidet - állíthatunk elő. A szakember számára nyilvánvaló, hogy az ilyen módosított peptidek vagy mimotópok nem feltétlen korlátozódnak a természetesen előforduló 20 aminosavra. Ezenfelül, e peptideket a technikában ismert eljárásokkal gyűrűvé lehet zárni abból a célból, hogy a peptidet abba a konformációba kényszerítsük, amelyben a peptidszekvencia leginkább megközelíti a teljes molekula által biztosított környezetben fennálló alakját. A peptid gyűrűvé zárásának előnyös eljárása közé tartozik az egy pár, a diszulfidhíd kialakulását lehetővé tevő cisztein aminosav addíciója.

Továbbá, a szakember számára nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti mimotópok vagy immunogének nagyobbak is lehetnek, mint a fent meghatározott epitópok, és mint ilyenek tartalmazhatják a találmány tárgyát képező szekvenciákat. Eszerint, a találmány szerinti mimotópok mindkét végükön tartalmazhatnak számos, természetes aminosavakból álló, hozzáadott N- és/vagy C-terminális kiterjesztéseket. A peptid mimotópok a természetes szekvenciák retroszekvenciái - azaz fordított orientációjú szekvenciái - is lehetnek; vagy esetleg a szekvenciák teljes egészükben vagy legalábbis részben állhatnak D-sztereo aminosavakból (inverz szekvenciák). Emellett, a peptidszekvenciák tulajdonságukra nézve lehetnek retro-inverzek is, azaz amikor a szekvencia

orientációja fordított és emellett az aminosavak D-sztereo-izomerek. Az ilyen retro-inverz peptideknek például az az előnye, hogy mivel a szervezet nem tekinti ezeket sajátjának, ezzel legyőzhetők az immunrendszer autotoleranciája („self-tolerance”) okozta problémák.

Esetleg, bizony eljárások, mint például a fág-prezentációs eljárás [EP 0552.267.B1 sz. európai közzétételi irat] alkalmazásával, peptid mimotópokat azonosíthatunk olyan antitestek felhasználásával, amelyek képesek a találmány szerinti epitópokhoz önmagukban kötődni. Ezen eljárással nagyszámú, a natív peptid szerkezetét utánzó, és így a natív peptid elleni antitesteket megkötni képes peptidszekvenciák állíthatók elő, amely peptidszekvenciák önmagukban a natív peptiddel nem szükségszerűképpen homológok jelentős mértékben. E megközelítés jelentős előnyökkel bírhat, mivel lehetővé teszi annak valószínűségét, hogy fokozott immunogén tulajdonságú peptideket azonosítsunk, illetve legyőzzünk bármely, esetleg a sajátantigén-toleranciából eredő - natív peptidszekvenciákkal kapcsolatba hozható - problémát. Ezenfelül, ezen eljárás a felismert mimotópszekvenciák között előforduló kémiai tulajdonságokat illetően lehetővé teszi az egyes natív peptidek felismerési mintázatának azonosítását.

A peptid immunogén vivőanyaghoz történő kovalens kötése kivitelezhető a technikában ismertek szerint. Így például, közvetlen kovalens kötés létrehozható karbodiimid, glutáraldehid vagy (N-[γ -maleimidobutiriloxi]-szukcimidészter alkalmazásával, illetve kereskedelmi forgalomban ál-

talánosan beszerezhető hetero-bifunkcionális linkerek, például CDAP és SPDP, segítségével (a gyártó utasításait követve). A kapcsolási reakció után az immunogén dialízissel, gélszűréssel, valamilyen frakcionálási eljárással, stb. könnyen izolálható és tisztítható.

A találmány szerinti immunogéneknél alkalmazott vivőanyagok típusai a szakember számára ismertek. A vivőanyag funkciója az, hogy citokinsegítséget biztosítson a peptid elleni immunválasz indukálása előmozdítása céljából. A találmány szerinti megoldásban alkalmazható vivőanyagok nem teljes listájába tartoznak az alábbiak: kürtőscsiga („keyhole limpet”) hemocianin (KLH), szérumalbuminok, mint például borjú-szérumalbumin (BSA), inaktivált bakteriális toxinok, mint például tetanusz vagy diftéria toxinok (TT és DT), vagy ezek rekombináns fragmentumai (például, a TT „C”-fragmentumának 1. doménje, vagy a DT transzlokációs doménje), vagy a tuberkulin tisztított fehérjeszármazéka (PPD). Mimotópokat vagy epitópokat esetleg konjugáltathatunk közvetlenül liposzóma vivőanyagokhoz, amelyek az eddigieken felül T-sejt segítséget biztosító immunogént is tartalmaznak. A mimotóp és a vivőanyag aránya előnyösen 1:1-től 1:20-ig terjed, és minden egyes vivőanyag előnyösen 3-15 peptidet hordoz.

A találmány egy megvalósítási módja szerint előnyös vivőanyag a *Haemophilus influenzae* „D” proteinje. A „D” protein a *Haemophilus influenzae*-ből származó IgD-kötő protein, amelyet a Forsgren szabadalmaztatott [WO 91/18926 sz. nemzetközi közzétételi irat; EP 0.594.610.B1 sz. európai

közzétételi irat]. Bizonyos körülmények között, például rekombináns immunogén expressziós rendszerekben, kívánatos lehet a „D” protein fragmentumait, például - a „D” protein N-terminális 100-110 aminosavát tartalmazó - „D 1/3.” proteint [GB 9717953.5 sz. nagy-britanniai közzétételi irat], alkalmazni.

A találmány szerinti peptidek bemutatásának másik előnyös módja rekombináns fúziós molekulával kapcsolatos. Például, EP 0.421.635B sz. európai közzétételi irat leírja a kimérikus hepadnavírus „core” antigén-részecskéinek alkalmazását idegen peptidszekvenciák vírusszerű részecskék formájában történő bemutatására. Mint ilyen, a találmány szerinti immunogének tartalmazhatnak hepatitis B „core” antigénből álló kimérarészecskék által bemutatásra kerülő peptideket. Ezenfelül, a rekombináns fúziósfehérje tartalmazhatja a találmány szerinti mimotópokat és emellett valamilyen vivőfehérjét, mint például az influenza vírus NS1-e. Bármilyen, a találmány részét képező, rekombinánsan expresszált fehérje, illetve az említett immunogént kódoló nukleinsav szintén a találmány egy szempontját képezi.

A találmány szerinti megoldásban alkalmazott peptideket a technikában ismert szilárdfázisú szintézissel könnyen elő lehet állítani. Alkalmas szintézisek végezhetők a „T-BOC” vagy „F-MOC” eljárásokkal. Ciklikus peptideket szintetizálhatunk a jól ismert „F-MOC” eljárást és poliamidgyantát alkalmazó szilárdfázisú szintézissel a teljesen automatizált berendezésben. Esetleg, a szakember jól ismeri azokat a szükséges laboratóriumi eljárásokat, amelyekkel a

folyamatot manuálisan is el lehet végezni. A szilárdfázisú szintézis módszereit és eljárásait már leírták [Atherton és Sheppard, „Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach” kiad.: IRL, Oxford University Press (1989)]. Esetleg, a peptideket rekombináns úton is elő lehet állítani. Ez esetben a mimotópokat kódoló nukleinsav-molekulákat baktérium- vagy emlőssejtvonalban expresszáljuk, majd az expresszált mimotópot tisztítjuk. Proteinek és peptidek rekombináns úton történő expressziója a technikában jól ismert, és le van írva [Maniatis, Fritsch, és Sambrook, és mtsai. „Molecular Cloning, a Laboratory Manual”, kiad.: Cold Spring Harbor, New York (1989)].

A találmány szerinti polipeptidek vagy immunogén fragmentumok lehetnek „érett” protein formájában vagy képezhetik valamely nagyobb protein, például prekursor- vagy fúziósfehérje, részét. Gyakran előnyös, ha további szekréciós vagy „leader” szekvenciákat, pro-szekvenciákat, a tisztítást elősegítő szekvenciákat - mint például több hisztidin aminosavat - tartalmazó aminosav-szekvenciákat vagy a rekombináns előállítás során a stabilitás céljaira szolgáló további szekvenciákat is beépítünk. Továbbá, a végső molekula immunogén hatását növelő exogén polipeptid vagy lipid farok vagy polinukleotid-szekvenciák hozzáadása is a találmány tárgykörébe tartozik.

A találmány egy szempontja szerint, a találmány tárgyát a találmány szerinti polipeptidet, vagy annak fragmentumát és különböző alosztályokba sorolt immunglobulinok (IgG, IgM, IgA, IgE) nehéz- vagy könnyűlánc konstans régi-

ójának különböző részeit tartalmazó fúziósfehérjék képezik. Immunglobulinként előnyös az emberi IgG, konkrétan IgG1, nehézláncának konstans régiója, amely esetében a fúzió a „hinge” régióban történik. A találmány szerinti konkrét megoldásban, az Fc részt egyszerűen úgy távolítjuk el, hogy az „Xa” véralvadási faktor által hasítható vágóhelyet építünk be. Továbbá, a találmány tárgyát képezik e fúziós fehérjék génsebészeti úton történő előállítására szolgáló eljárások, illetve e fehérjék alkalmazása diagnosztikai és terápiás célokra, és hatóanyagok tesztelésére. A találmány további szempontja szerint, a találmány tárgyát e fúziósfehérjéket kódoló polinukleotidok képezik. Fúziósfehérje-technológiával kapcsolatos példákat a WO94/29458 és WO94/22914 sz. nemzetközi közzétételi iratokban találhatunk.

A fehérjék konjugálhatók kémiai eljárásokkal, vagy rekombináns fúziósfehérjeként lehet őket expresszálni, ahol a fúzió lehetővé teszi, hogy valamely expressziós rendszerben a proteint a nem fuzionáltatott fehérjével összehasonlítva nagyobb mennyiségben állítsuk elő. A fúziós partner elősegítheti T-helper-epitópok (immunológiai fúziós partner), előnyösen az emberi szervezet által felismerhető T-helper-epitópok, biztosítását, vagy hozzájárulhat a fehérje - natív rekombináns fehérjénél - nagyobb mennyiségben történő expresszáálásához (expresszió fokozás). A fúziós partner előnyösen immunológiai fúziós partner és az expressziót fokozó partner is egyben.

Fúziós partner lehet *Haemophilus influenzae*-ből származó D-protein és az influenzavírus nem strukturális proteinjé, az NS1 (hemagglutinin). Egy másik immunológiai fúziós partner az LYTA néven ismert protein. Előnyös a molekula C-terminális részének alkalmazása. A *lytA* gén [Gene, 43, 265-272 (1986)] által kódolt, N-acetil-L-alaninamidázt - amidáz LYTA-t - szintetizáló *Streptococcus pneumoniae*-ből származó LYTA a peptidoglikán váz bizonyos kötéseit specifikusan lebontó autolizin. A LYTA protein C-terminális doménje felelős a kolinhoz vagy bizonyos kolinanalógokhoz - mint például DEAE - való affinitásért. Ezt a tulajdonságot aknázták ki a fúziósfehérjék expresszáására alkalmas, *E. coli* C-LYTA-t expresszáló plazmidok kifejlesztésénél. N-terminális végüknél C-LYTA-fragmentumot tartalmazó hibridfehérjék tisztítását már korábban leírták [Biotechnology 10, 795-798 (1992)]. A LYTA molekula C-terminális végén található, a 178. aminosavnál kezdődő ismétlődő rész, például 188-305. aminosavak, alkalmazása is lehetséges.

A találmány tárgyát képezik a fent említett polipeptidek variánsai is, amelyek a megfelelő konzervált aminosav-szubsztitúciók tekintetében eltérnek, azaz valamely aminosavat másik, hasonló tulajdonságú aminosav helyettesít. Jellemző szubsztitúciók lehetnek az Ala, Val, Leu és Ile között; a Ser és Thr között; az Asp és Glu savas aminosavak között; Asn és Gln között; és a bázikus Lys és Arg aminosavak között; vagy az aromás Phe és Tyr között. Különösen előnyösek azok a variánsok, amelyekben számos, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 vagy 1 aminosav-szubsztitúciók, deléciók,

vagy addíciók, illetve ezek bármilyen kombinációja található.

A találmány szerinti polipeptideket bármilyen alkalmas eljárással elő lehet állítani. Ilyen polipeptidek lehetnek természetes körülmények között előforduló polipeptidek, rekombináns úton előállított polipeptidek, szintetikus úton előállított polipeptidek, vagy ezen eljárások kombinálásával előállított polipeptidek. Ilyen polipeptidek előállítási eljárásai a technikában jól ismertek.

A találmány egy további szempontja szerint, a találmány tárgyát CASB618 polinukleotidok képezik. Ilyen polinukleotidok közé tartozó izolált polinukleotidok a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciával, a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia teljes terjedelmére nézve legalább 70%-ban azonos, előnyösen legalább 80%-ban azonos, előnyösebben legalább 90%-ban azonos, még előnyösebben legalább 95%-ban azonos polipeptideket kódoló nukleotidszekvenciát tartalmaznak. Ennek értelmében, messze előnyösek a legalább 97%-ban azonos polipeptidek, míg azok, amelyek 98-99%-ban azonosak ennél sokkal előnyösebbek, és azok, amelyek legalább 99%-ban azonosak a legelőnyösebbek. Ilyen polinukleotidok közé tartozik a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polipeptidet kódoló, a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott nukleotidszekvenciát tartalmazó polinukleotid.

A találmány szerinti további polinukleotidok közé tartoznak a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polipeptidet kódoló nukleotidszekvenciával, a teljes kódoló régió tekintetében legalább 70%-ban azonos, előnyösen legalább 80%-ban azonos, előnyösebben legalább 90%-ban azonos, még előnyösebben legalább 95%-ban azonos nukleotidszekvenciát tartalmazó, izolált polinukleotidok. Ennek értelmében, messze előnyösek a legalább 97%-ban azonos polinukleotidok, míg azok, amelyek 98-99%-ban azonosak, ennél sokkal előnyösebbek, és a legelőnyösebbek azok, amelyek legalább 99%-ban azonosak.

A találmány szerinti további polinukleotidok közé tartoznak a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti nukleotidszekvenciával, a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia teljes terjedelmére nézve legalább 70%-ban azonos, előnyösen legalább 80%-ban azonos, előnyösebben legalább 90%-ban azonos, még előnyösebben legalább 95%-ban azonos nukleotidszekvenciát tartalmazó, izolált polinukleotidok. Ennek értelmében, messze előnyösek a legalább 97%-ban azonos polinukleotidok, míg azok, amelyek 98-99%-ban azonosak, ennél sokkal előnyösebbek, és a legelőnyösebbek azok, amelyek legalább 99%-ban azonosak. Ilyen polinukleotidok közé tartozik a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polinukleotid tartalmazó polinukleotid mellett a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polinukleotid is. E polinukleotid alkalmas plazmidba vagy rekombináns mikroorganizmus-eredetű vektorba beil-

leszthető és immunizálásra alkalmazható [lásd például: Wolff és mtsai., Science 247, 1465-1468 (1990); Corr és mtsai., J. Exp. Med. 184, 1555-1560 (1996); Doe és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8578-8583 (1996)]. A találmány tárgyát képezik az összes fent leírt nukleotidszekvenciával komplementer polinukleotidok.

A találmány tárgya továbbá CASB618 polipeptid immunológiai fragmentumát kódoló, a fentiekben meghatározott polinukleotid.

A szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott nukleotidszekvencia a *Homo sapiens* 15. kromoszóma 163 P₁₀ klón, 15-ös szakaszának térképével (katalógusszám: GB_HTG4:AC009700) mutat homológiát. A szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott nukleotidszekvencia a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polipeptid 320 aminosavát kódoló polipeptidet tartalmazó polipeptidet kódoló cDNS-szekvencia (259-1219. nukleotidok). A szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polipeptidet kódoló nukleotidszekvencia azonos lehet a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvenciában lévő, polipeptidet kódoló szekvenciával; vagy a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvenciában lévő szekvenciától, a genetikai kód redundanciája (degeneráltsága) miatt ugyan eltér, azonban így is a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polipeptidet kódolja. A szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polipeptid, a *Caenorhabditis elegans* hipotetikus 42,1 kd

méretű, c06e1.3 jelzésű proteinje (katalógusszám: P34298) kivételével, nem hozható kapcsolatba egyetlen ismert funkciójú proteinnel sem.

A találmány szerinti előnyös polipeptidekkel és polinukleotidokkal kapcsolatban elvárás az, hogy - többek között - biológiai funkciók/tulajdonságok tekintetében a velük homológ polipeptidekhez és polinukleotidokhoz hasonlítsanak. Továbbá, a találmány szerinti előnyös polipeptidek, immunológiai fragmentumok és polinukleotidok a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia, vagy a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia, megfelelően, legalább egy aktivitásával rendelkezzenek.

A találmány tárgyát képezik olyan részleges vagy más nem teljes polinukleotid- és polipeptid-szekvenciák is, amelyeket a megfelelő, a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti és a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti teljes hosszúságú szekvenciák meghatározása előtt azonosítottak.

Eszerint, a találmány egy további szempontja szerint, a találmány tárgya izolált polinukleotid, amely:

(a) a szekvencialistában 3. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti nukleotidszekvenciával, a szekvencialistában 3. azonosítószámon megadott szekvencia teljes terjedelmére nézve legalább 70%-ban azonos, előnyösen legalább 80%-ban azonos, előnyösebben legalább 90%-ban azonos, még előnyösebben legalább 95%-ban, még előnyösebben legalább 97-99%-ban azonos nukleotidszekvenciát tartalmaz;

(b) nukleotidszekvenciája a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti nukleotidszekvenciával, a szekvencialistában 3. azonosítószámon megadott szekvencia teljes terjedelmére nézve legalább 70%-ban azonos, előnyösen legalább 80%-ban azonos, előnyösebben legalább 90%-ban azonos, még előnyösebben legalább 95%-ban, még előnyösebben legalább 97-99%-ban azonos;

(c) a szekvencialistában 3. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polinukleotid.

A szekvencialistában 3. azonosítószámon megadott nukleotidszekvencia EST (expresszált szekvencia jel, Expressed Sequence Tag) szekvenciákból származik. A szakember számára nyilvánvaló, hogy az EST-szekvenciákban elkerülhetetlenül előfordulnak bizonyos nukleotidszekvencia-leolvasási hibák [lásd: Adams és mtsai., Nature 377 (supp)3 (1996)]. Eszerint, a szekvencialistában 3. azonosítószámon megadott szekvencia és az általa kódolt peptidszekvencia esetében a szekvencia pontossága bizonyos határok között értelmezendő.

A találmány szerinti polinukleotidokat előállíthatjuk standard klónozó és szűrővizsgálati eljárásokkal rákos emberi vastagbélsejtekből, -tüdőráksejtekből, -méhnyaksejtekből, és magzati szövetekből származó mRNS-ből készített cDNS-könyvtárból [például, Sambrook és mtsai., „Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]. A találmány szerinti polinukleotidokat előállíthatjuk természetes forrásokból is, mint például genomikus DNS-könyvtárból

tárból vagy jól ismert és kereskedelmileg elérhető eljárásokkal megszintetizálhatjuk.

Amennyiben a találmány szerinti polinukleotidokat a találmány szerinti polipeptidek rekombináns úton történő előállítására alkalmazzuk, a polinukleotid önmagában tartalmazhatja az érett fehérje kódoló szekvenciáját, vagy pedig egy leolvasási keretben az érett fehérjét kódoló szekvenciát más kódoló szekvenciákkal - például „leader” vagy szekréciós szekvencia, pre-, vagy pro- vagy prepro-fehérjeszekvenciák, vagy más fúziós fehérjerészek - együtt. Például, a polinukleotid a fuzionált polipeptid tisztítását elősegítő markerszekvenciát is kódolhat. A találmány bizonyos előnyös megvalósítási módjai szerint, a markerszekvencia 6 hisztidinből álló peptid, mint amilyen a pQE vektor (Qiagen, Inc.) része [Gentz és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 821-824 (1989)], vagy HA „tag”. A polinukleotid tartalmazhat nem kódoló 5' és 3' szekvenciákat is, mint például átírt, de nem transzlálódó szekvenciákat, „splicing” és poliadenilációs szignálokat, riboszómakötőhelyeket és a mRNS-t stabilizáló szekvenciákat.

A találmány további megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képező polinukleotidok olyan, a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptid-változatokat kódolnak, amelyekben például 5-10, 1-5, 1-3, 1-2, vagy 1 aminosavat szubsztituáltak, töröltek vagy hozzáadtak, illetve ezek bármilyen kombinációjával megváltoztattak.

A szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott nukleotidszekvenciával azonos vagy lényegében azonos polinukleotidokat hibridizációs próbaként alkalmazni lehet cDNS és genomikus DNS esetében, illetve láncindítóként nukleinsav-amplifikációs (PCR) reakciókban teljes hosszúságú, a találmány szerinti polipeptidet kódoló cDNS vagy genomikus DNS izolálására és a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvenciával nagyfokú homológiát mutató más gének (többek között emberi eredetű paralógokat kódoló gének, és az embertől eltérő eredetű fajokból származó ortológokat és paralógokat kódoló gének) izolálására. E nukleotidszekvenciák a referens molekulával jellemzően 70%-ban azonosak, előnyösen 80%-ban azonosak, előnyösebben 90%-ban azonosak, legelőnyösebben pedig 95%-ban azonosak. A próbák vagy láncindítók általában legalább 15 nukleotidot tartalmaznak, előnyösen legalább 30 nukleotidot és esetleg 50 nukleotidot tartalmaznak. Különösen előnyös láncindítók 20-50 nukleotidot tartalmaznak. Konkrétan, állati eredetű homológ szekvenciákból származó polipeptideket vagy polinukleotidokat immunogénként alkalmazni lehet az emberi génnel keresztreagáló immunválasz kiváltására.

A találmány szerinti polipeptidet kódoló polinukleotidot, beleértve az embertől eltérő fajból származó homológokat is, elő lehet állítani oly módon, hogy a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia vagy annak fragmentuma szerinti, jelzett próbával sztringens hibridizációs körülmények között megfelelő könyvtáron szűrővizsgálatot végzünk, és izoláljuk a polinukleotid szek-

venciát tartalmazó teljes hosszúságú cDNS vagy genomikus klónokat. Ilyen hibridizációs eljárások a szakember számára jól ismertek. Előnyös hibridizációs körülmények 42°C-on 12 órán át végzett hibridizálást az alábbiakat tartalmazó oldatban: 50% formamid, 5xSSC (150 mM NaCl, 15 mM trinátrium-citrát), 50 mM nátriumfoszfát (pH 7,6), 5xDenhardt-féle oldat, 10% dextránszulfát, és 20 µg/ml denaturált, fragmentált („sheared”) lazacsperma-DNS; és azt követően a filterek 65°C-on 0,1xSCC-ben történő mosását tartalmazzák. Így, a találmány oltalmi körébe tartoznak a megfelelő könyvtárak, sztringens hibridizációs körülmények között a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia vagy annak fragmentuma szerinti jelzett próbával végzett szűrővizsgálata során előállítható polinukleotidok is.

A szakember számára nyilvánvaló, hogy sok esetben valamely izolált cDNS nem teljes, azaz a polipeptidet kódoló régió a cDNS 5' végénél hiányos.

Teljes hosszúságú cDNS előállítására, vagy rövid cDNS megnövelésére számos, szakember számára jól ismert eljárás létezik, ilyenek például a cDNS végek gyors amplifikálására szolgáló eljárások (Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE) [lásd, például: Frohman és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002 (1988)]. Az eljárás jelenlegi módosításainak egyik példája a Marathon™ eljárás (Clontech Laboratories, Inc.), amely például lényegesen leegyszerűsítette a hosszabb cDNS-ek keresését. A Marathon™ eljárás során valamely kiválasztott szövetből kivont mRNS-ből cDNS-t állítunk elő és minkét végéhez „adaptor” szekvenciá-

kat ligálunk. A cDNS hiányzó végét nukleinsav-amplifikációval (PCR), génspecifikus és „adaptor”-specifikus oligonukleotid láncindítók alkalmazásával, amplifikáljuk. Ezután a PCR reakciót „nested” láncindítók alkalmazásával megismételjük. Ezek olyan láncindítók, amelyek az amplifikált terméken belüli, temperálás során bekövetkező hibridizációra („anneal”) terveztünk (jellemzően, valamely adaptorspecifikus láncindító az adaptorszekvenciában egy további 3'-véget hoz létre hibridizációval, míg a génspecifikus láncindító az ismert szekvenciában egy további 5'-véget hoz létre hibridizációval). E reakció termékeit DNS-szekvenálással analizálhatjuk és a terméket közvetlenül a már meglévő cDNS-sel összekapcsolva teljes hosszúságú cDNS-t állíthatunk elő, vagy külön, teljes hosszúságú PCR reakciót hajtunk végre, amelynél az 5' láncindító tervezésében felhasználjuk az új szekvenciainformációt.

A találmány szerinti rekombináns polipeptideket a technikában jól ismert eljárásokkal állíthatjuk elő expressziós rendszert tartalmazó genetikailag módosított gazdasejtből. Eszerint, a találmány további szempontja szerint, a találmány tárgya a találmány szerinti polinukleotidot tartalmazó expressziós rendszer, ilyen expressziós rendszerrel genetikailag módosított gazdasejtek, és a találmány szerinti polipeptidek előállítása rekombináns eljárásokkal. Ilyen proteinek előállítására sejtméntes transzlációs rendszerek is alkalmasak, amelyek-

ben a találmány szerinti DNS-konstrukciókból származó RNS-eket alkalmazzuk.

Rekombináns előállításra, gazdasejtet genetikailag módosítunk a találmány szerinti polinukleotidok beépítése céljára szolgáló expressziós rendszerekkel vagy annak részeivel. Polinukleotidok gazdasejtekbe történő bevitelére hatással lehetnek különböző, sok laboratóriumi kézikönyvben [például, Davis és mtsai., „Basic Methods in Molecular Biology” (1986); Sambrook, és mtsai. „Molecular Cloning, a Laboratory Manual”, kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)] leírt eljárások. Ilyen előnyös eljárások közé tartozik, például, a kalcium-foszfát-transzfekeció, DEAE-dextrán által közvetített transzfekeció, transzvekeció, mikroinjekció, kationos lipid által közvetített transzfekeció, elektroporáció, transzdukció, kaparásos bevitel („scrape loading”) ballisztikus bevitel vagy fertőzés.

A találmány szerinti fehérjéket előnyösen transztioeredoxinnal (TIT) együtt expresszáljuk. A transz-tioeredoxinnal végzett koexpresszió előnyös a cisz-tioeredoxinnal szemben, mert így az antigént mentesíteni tudjuk a tioeredoxintól anélkül, hogy proteázt alkalmaznánk. Tioeredoxinnal végzett koexpresszió megkönnyíti a találmány szerinti fehérjék feloldását. Tioeredoxinnal végzett koexpresszió jelentős mértékben hat a fehérjetisztítás kitermelésére, a tisztított fehérje oldhatóságára és minőségére.

Megfelelő gazdák lehetnek például baktériumsejtek, mint például *Streptococcusok*, *Staphylococcusok*, *E. coli*, *Streptomyces* és *Bacillus subtilis* sejtek; gombasejtek, mint például élesztősejtek és *Aspergillus* sejtek; rovarsejtek, mint például *Drosophila* S2 és *Spodoptera* Sf9 sejtek; állati sejtek, mint például CHA, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 és Bowes-féle melanómából származó sejtek; és növényi sejtek.

A különböző expressziós rendszerek alkalmazhatók, például kromoszómális, episzómális és víruseredetű rendszerek, például bakteriális plazmidokból, bakteriofágokból, transzpozonokból, élesztőepiszómákból, inzerációs elemekből, élesztőeredetű kromoszómális elemekből, vírusokból - mint például bakulovírusok, papovavírusok, mint például SV40, vacciniavírusok, adenovírusok, baromfihimlő-vírusok, pseudorabies vírusok, és retrovírusok - származó vektorok, és ezek kombinációjából származó vektorok, amilyenek például plazmidokból és bakteriofág eredetű genetikai elemekből származó vektorok, mint például kozmidok és fágmidok. Az expressziós rendszerek tartalmazhatnak expressziót szabályzó és egyben expressziót előidéző szabályozó régiókat. Általában, bármilyen rendszer vagy vektor alkalmazható, amely képes gazdaszervezetben polinukleotidot fenntartani, szaporítani vagy expresszálni polipeptid előállítására céljából. A megfelelő nukleotidszekvenciát bármilyen jól ismert és rutin eljárással - mint például, amelyeket a már említett *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* c. könyv [Sambrook és mtsai., mint fent] említ - be lehet illeszteni valamely

expressziós rendszerbe. A kívánt polipeptidbe beépíthetők a transzlált fehérjének az endoplazmatikus retikulum üregébe, a periplazmatikus térbe vagy az extracelluláris környezetbe történő szekrécióját lehetővé tevő alkalmas szignálok is. Ezek a szignálok lehetnek a polipeptiden belül, vagy lehetnek heterológ szignálok.

Az expressziós rendszer rekombináns élő mikroorganizmus, mint például vírus vagy baktérium, is lehet. A kérdéses gént be lehet illeszteni élő rekombináns vírusba vagy baktériumba. Ezen élő vektorral végzett inokuláció és *in vivo* fertőzés az antigén *in vivo* expresszálasához és immunválasz indukálásához vezet. E célra alkalmazott vírusok és baktériumok például az alábbiak: poxvírusok (pl. vaccinia, baromfihimlő, kanárihimlő), alfavírusok (Sidbis vírus, Semliki Forest Vírus, venezuelai lőenkefalitisz-vírus), adenovírusok, adeno-asszociált vírus, picornavirus (poliovírus, rhinovírus), herpeszvírusok (varicella zoster vírus, stb.), *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, BCG. Ezek a vírusok és baktériumok lehetnek virulensek, vagy élő vakcinák előállítása céljából különböző módon attenuáltak. Ilyen élő vakcinák szintén a találmány részét képezik.

A találmány szerinti polipeptidek jól ismert eljárásokkal kivonhatók és tisztíthatók a rekombináns sejtttenyészetekből. Ilyen eljárások például az alábbiak: ammónium-szulfát vagy etanol precipitáció, savas extrakció, anion- vagy kationcserélő-kromatográfia, foszfocellulóz-kromatográfia, hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia, affinitáskromatográfia, hidroxilapatit-kromatográfia és

lektinkromatográfia. Tisztításra legelőnyösebb a fémion-affinitáskromatográfia (IMAC). Amennyiben a polipeptid az intracelluláris szintézis, az izoláció vagy a tisztítás során denaturálódik, a fehérjék újrafelgombolyítására („refolding”) alkalmas jól ismert eljárásokkal az aktív konformációt regenerálhatjuk.

A találmány egy másik jelentős szempontja szerint a találmány tárgya eljárás immunválasz indukálására, újra-megerősítésére, vagy modulációjára valamely emlősfajban, amely eljárásban az emlőst a találmány szerinti teljes polipeptiddel vagy polinukleotiddal, vagy annak fragmentumával inokuláljuk. Az inokulálásban olyan mennyiséget alkalmazunk, amely elégséges arra, hogy rák és autoimmun betegségek és rokon állapotok megelőzésére vagy terápiás kezelésére antitest és/vagy T-sejt immunválaszt váltson ki. A találmány további szempontja szerint, a találmány tárgya eljárás immunválasz indukálására, újra-megerősítésére, vagy modulációjára valamely emlősfajban, amely eljárásban a találmány szerinti polipeptidet - a polipeptidet kódoló polinukleotid expresszióját *in vivo* irányítani képes vektor vagy sejt útján - bejuttatjuk, ezáltal olyan immunológiai választ váltunk ki, amely képes az emlősben a betegség kezelésére vagy megelőzésére alkalmas immunválaszt kelteni.

A találmány további szempontja szerint, a találmány tárgya immunológiai/vakcinakészítmény (összetétel) amely, emlősgazdába történő bevitel esetén, az illető emlősfajban immunválaszt indukál, újra-megerősít, vagy modulál a találmány szerinti polipeptiddel kapcsolatban, ahol a készítmény

a találmány szerinti polipeptidet vagy polinukleotidot vagy annak - fent meghatározott - immunológiai fragmentumát tartalmazza. A vakcinakészítmény tartalmazhat továbbá alkalmas vivőanyagot is. Miután a polipeptid a gyomorban lebomolhat, ezért előnyös a parenterális bevitel (például, szubkután, izomba beadott, intravénás vagy intradermális injekció). Parenterális beadásra alkalmas készítmények lehetnek vizes vagy nem vizes steril injekciós oldatok, amelyek tartalmazhatnak antioxidánsokat, puffereket, bakteriosztatikumokat és olyan oldatokat, amelyek a páciens vérével izotónikussá állítják be a készítményt; és diszpergáló vagy sűrűsítő anyagot esetleg tartalmazó vizes és nem vizes steril szuszpenziók. A készítmény dózisegységeket vagy többszörös dózissokat tartalmazó konténerekbe - zárt ampullák és tárolóedények (pl. üvegcsék) szerelhetők ki és olyan fagyasztva-száritott állapotban tárolhatók, amelyekhez közvetlenül az alkalmazás előtt csak steril vizet kell adni.

A találmány további szempontja szerint a találmány tárgya immunválaszok indukálása *in vitro* a találmány szerinti polipeptid vagy polinukleotid teljes egésze, vagy fragmentuma vagy a találmány szerinti polipeptidet vagy polinukleotidot tartalmazó molekula ellen emlőseredetű immunrendszerből származó sejtek alkalmazásával, majd ezen aktivált sejtek infúzióval történő visszajuttatása az emlősbe a betegség kezelése céljából. Az immunrendszerből származó sejteket aktiválhatjuk a találmány szerinti polipeptid vagy polinukleotid teljes egészével, vagy a találmány szerinti polipeptidet vagy polinukleotidot tartal-

mazó molekulával végzett *in vitro* inkubálással különböző immunmodulátor-molekulák jelenlétében vagy azok nélkül.

A találmány további szempontja szerint a találmány tárgya valamely emlős immunizálása a találmány szerinti polipeptiddel vagy a találmány szerinti polipeptidet tartalmazó molekulával végzett *in vitro* terhelés („loading”) útján módosított antigén-bemutató sejtek *in vivo* immunogénikus úton történő beadásával. Esetleg, antigén-bemutató sejteket *in vitro* transzfektálhatunk a találmány szerinti polipeptid teljes egészét, vagy fragmentumát, illetve a találmány szerinti polipeptidet tartalmazó molekulát tartalmazó vektorral a megfelelő polipeptid expresszállása céljából és a sejteket *in vivo* immunogénikus úton adjuk be.

A találmány szerinti készítmény immunogenitásának fokozására a vakcinakészítmény tartalmazhat adjuvánsrendszereket is. Az adjuvánsrendszer előnyösen elsősorban TH1-választ indukál.

Valamely immunválaszt nagyjából két, extrém kategóriába sorolhatunk: humorális immunválaszok (az antitestek jellemzik) vagy sejtes immunválaszok (sejtes védekező mechanizmusok). E két kategória TH1-típusú- (sejt által közvetített) és TH2-típusú immunválasz (humorális válasz) néven ismert.

Az extrém TH1-típusú immunválaszokat az antigén-specifikus, halotípusra korlátozódó, citotoxikus T-limfociták, és a természetes ölüsejt-válaszok jellemzik. Egerekben a TH1-típusú válaszok során gyakran IgG2a altí-

pusba sorolt antitestek, míg az emberekben az IgG1 antitestek keletkeznek. A TH2-típusú immunválaszok során az immunoglobulin izotípusok széles skálája, így IgG1, IgA és IgM, keletkezik.

Úgy gondoljuk, hogy a két típusú immunválasz kifejlődésének hátterében a citokinek állnak. Egy adott antigénnel szemben, a TH1-típusú citokinek típusú magas koncentrációja inkább a sejtes immunválasz indukálást segíti elő, míg a TH2-típusú citokinek típusú magas koncentrációja esetén inkább a humorális immunválasz indukálása kerül előtérbe.

A TH1- és TH2-típusú immunválasz közötti különbségtétel nem abszolút. A valóságban valamely egyed általi immunválaszt úgy kell értelmezni, hogy az predominánsan TH1-típusú vagy predominánsan TH2. Azonban, gyakran kényelmesebb a citokinek családjait az egérezetű CD4+ve T-sejt klónok esetében leírtak [Mosmann és Coffman, Annu. Rev. Immunol. 7, 145-173 (1989)] szerint tekintetbe venni. Tradicionálisan, a TH1-típusú válaszok a T-limfociták általi IFN- γ és IL-2 citokinek előállításával hozhatók kapcsolatba. A TH1-típusú immunválaszokkal gyakran közvetlenül összefüggésben álló más citokineket - mint például IL-12 - nem a T-sejtek termelik. Ezzel szemben a TH2-típusú válaszok az IL-4, IL-5, IL-6 és IL-13 szekrécióval vannak kapcsolatban.

Ismert, hogy bizonyos vakcinaadjuvánsok konkrétan alkalmasak vagy TH1 vagy pedig TH2-típusú citokinválasz stimulálására. Hagyományosan, vakcinálást vagy fertőzést követően az immunválasz TH1:TH2 egyensúlyának legjobb indikáto-

ra az, ha például antigénnel végzett restimulációt követően *in vitro* megmérjük a T-limfociták általi termelt TH1 vagy TH2 citokineket, és/vagy megállapítjuk az antigénspecifikus antitestválasz IgG1:IgG2 arányát.

Így, valamely TH1-típusú adjuvánsnak azt az adjuvánst tekintjük, amely antigénnel végzett *in vitro* restimulációt követően, valamely izolált T-sejt-populációt arra ösztönöz, hogy magas koncentrációban állítson elő TH1-típusú citokineket, és előmozdítja mind a CD8+ citotoxikus T-limfociták, mind pedig a TH1-típusú izotípussal kapcsolatos, antigénspecifikus immunglobulin válasz kialakulását.

A TH1-sejtválasz stimulációját előnyben részesíteni képes adjuvánsok a WO 94/00153 sz. és a WO 95/17209 sz. nemzetközi közzétételi iratban vannak leírva.

Egy ilyen adjuváns a 3-De-O-acilezett monofoszforil lipid A (3D-MPL) (Ribi), amely ismert a GB 2220211 sz. nagy britanniai közzétételi iratból. Ez az anyag kémiaailag 4-, 5-, vagy 6-acilezett oldalláncokat tartalmazó 3-De-O-acilezett monofoszforil lipid A keverék, amelyet a Ribi Immunochem. (Montana, US) állít elő. A 3-De-O-acilezett monofoszforil lipid A előnyös formája a 0 689 454 B1 sz. európai szabadalom (SmithKline Beecham Biologicals, SA) tárgyát képezi.

A 3D-MPL szemcséi előnyösen elég kicsik ahhoz, hogy 0,22 mikron membránon keresztül sterilre lehessen szűrni [0 689 454 sz. európai szabadalom]. A 3D-MPL mennyisége dózisonként 10-100 µg, előnyösen 25-50 µg közötti tartományban

van, míg az antigéntartalom dózisonként előnyösen 2-50 µg közötti.

Másik előnyös adjuváns QS21-et - HPLC-vel tisztított, a *Quillaja saponaria* Molina kérgéből származó, nem toxikus frakció - tartalmaz. A QS21-et esetleg össze lehet keverni 3-De-O-acilezett monofoszforil lipid A-val (3D-MPL-lel), és esetleg valamilyen vivőanyaggal.

A QS21 előállítására szolgáló eljárás az 5.057.540 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalom tárgyát képezi.

QS21-et tartalmazó, nem reaktogén adjuvánskészítményeket már korábban leírtak [WO 96/33739 sz. nemzetközi közzétételi irat]. Ilyen QS21-et és koleszterint tartalmazó készítményekről kimutatták, hogy antigénnel együtt formulázva hatékony TH1-et stimuláló adjuvánsok.

A TH1-sejtválaszt előnyösen stimuláló további adjuvánsok közé tartoznak az immunmodulátor oligonukleotidok, például a WO 96/02555 sz. nemzetközi szabadalom tárgyát képező nem metilezett CpG-szekvenciák.

TH1-sejtválaszt előnyösen stimuláló adjuvánsként különböző, TH1-et stimuláló adjuvánsok - mint például a fent említettek - kombinációi is szóba jöhetnek. Például, QS21-et együtt lehet formulázni 3D-MPL-lel. A QS21:3D-MPL arány jellemzően 1:10-től 10:1 nagyságrendig; előnyösen 1:5-től 5:1-ig terjed, és gyakran lényegében 1:1. Optimális szinergizmushoz az előnyös tartomány 2,5:1-től 1:1-ig (3D-MPL:QS21) terjed.

A találmány szerinti vakcinakészítményben előnyösen vivőanyag is jelen van. A vivőanyag lehet olaj-a-vízben emulzió, vagy valamilyen alumínium só - mint például alumíniumfoszfát vagy alumíniumhidroxid.

Előnyös olaj-a-vízben emulzió metabolizálható olajat - mint például szkvalént, α -tokoferolt és Tween 80-at - tartalmaz. A találmány egy különösen előnyös megvalósítási módjában a találmány szerinti vakcinakészítményt ilyen emulzióban QS21-el és 3D-MPL-lel kombináljuk. Az olaj-a-vízben emulzió ezenfelül tartalmazhat még span 85-öt és/vagy lecitint és/vagy trikaprilint is.

Jellemzően emberi alkalmazásra QS21 és 3D-MPL a vakcinában dózisonként 1-200 μg tartományban - mint például 10-100 μg , előnyösen 10-50 μg - van jelen. Olaj-a-vízben emulzió jellemzően 2-10% szkvalént, 2-10% α -tokoferolt és 0,3-3% Tween 80-at tartalmaz. A szkvalén: α -tokoferol arány előnyösen egyenlő, vagy kevesebb, mint 1, miután ez az arány stabilabb emulziót biztosít. Egy százaléknyi mennyiségben Span 85 is jelen lehet. Bizonyos esetekben előnyös lehet, ha a találmány szerinti vakcina stabilizáló anyagot is tartalmaz.

Nem toxikus, olaj-a-vízben emulziók előnyösen nem toxikus olajat - pl. szkvalént vagy szkvalánt - emulgeátort - pl. Tween 80 - tartalmaznak vizes vivőanyagban. A vizes vivőanyag lehet, például, foszfáttal pufferezt sóoldat.

Különösen hatékony adjuvánskészítményt, amelyben az olaj-a-vízben emulzió QS21-t, 3D-MPL-t és tokoferolt tartalmaz írtak le a WO 95/17210 sz. nemzetközi közzétételi iratban.

A találmány tárgya továbbá polivalens vakcina-készítmény, mely a találmány szerint készítményt más antigénekkal - konkrétan rákos megbetegedések, autoimmun betegségek és hasonló állapotok kezelésére alkalmas antigénekkal - kombinálva tartalmazza. Ilyen polivalens vakcina-készítmény tartalmazhat a fentiekben leírt valamilyen, TH1-et indukáló adjuvánst.

A találmány tárgya továbbá a találmány szerinti polinukleotidokból származó láncindítók formájában lévő polinukleotidok alkalmazása, illetve a találmány szerinti polipeptidekre specifikus antitestek vagy reagensek formájában lévő polipeptidek alkalmazása diagnosztikai reagensként.

A rák kifejlődésének útvonalában bekövetkező nagyon korai változások kimutatását a vérben vagy szövetekben lehetővé tevő genetikai vagy biokémiai markerek azonosítása segíthet a paciens számára leginkább megfelelő kezelés meghatározásában. Pótlólagos tumormarkerek, mint például polinukleotid-expresszió, alkalmazhatók tumoros megbetegedések különböző formáinak és stádiumainak diagnosztizálására. A találmány szerinti polinukleotidok expressziós szintjének meghatározása alkalmas lehet mind a rákos elváltozások fázisának megállapítására, mind pedig a rákos szövetek természetének osztályozására. A szövettani vizsgálat alá vetett területekben a rosszindulatú szövet jelenlétének vagy hiá-

nyának meghatározásával végzett kiderítési folyamat nyomonköveti a rák fejlődését. Valamely rák agresszivitása markereinek, például valamely marker jelenléte a test különböző részeiben történő, azonosításával a találmány szerinti polinukleotidok segíthetnek a kiderítési folyamat tökéletesítésében. A rák, sejtmorfológián és a differenciálódás más markerein alapuló osztályozása leírja, hogy milyen teljességgel hasonlít valamely rák az azonos típusú, de normális szövethez. A találmány szerinti polinukleotidok alkalmasak lehetnek a rák osztályba sorolására és segíthetnek a rákos sejtek differenciálódási stádiumának meghatározásában.

A diagnosztikai vizsgálatok lehetőséget nyújtanak arra, hogy a rákra, autoimmun betegségekre és hasonló állapotokra való fogékonyságot diagnosztizáljuk vagy meghatározzuk oly diagnosztikai eljárásokkal, amelyekben meghatározzuk valamely alanyból származó mintában abnormálisan lecsökkent vagy megnövekedett polipeptid- vagy mRNS-szinteket. E diagnosztikai eljárás „differenciális expresszió” néven ismert. Az eljárásban megbetegedett és normális szövetek között összevetjük egy konkrét gén expresszióját. A megbetegedett és normális szövetben megállapított, polinukleotiddal összefüggő génnel, mRNS-sel vagy fehérjével kapcsolatos különbséget összehasonlítjuk, például molekulatömeg, aminosav- vagy nukleotidszekvencia, vagy relatív elterjedtség, a génben bekövetkezett valamilyen változás, vagy a gént szabályozó génben bekövetkezett valamilyen változás szempontjából a feltételezetten megbetege-

dett személyből vett szövetminta esetében kapott eredményekkel.

Csökkent vagy megnövekedett expressziót meg lehet mérni RNS szinten. PoliA RNS-t izolálunk először a megbetegedett és normális szövetből és, például, szövetmetszetekben *in situ* hibridizációval, reverz-transzkriptáz PCR-rel, poliA+mRNS-t tartalmazó Northern blotokkal, vagy bármilyen más közvetett PCR-eljárással meghatározzuk a differenciálisan expresszált, találmány szerinti polinukleotidnak megfelelő gén által kódolt mRNS-t. A normálissal összehasonlítva a megbetegedett szövetben valamely adott RNS csökkent vagy megemelkedett expressziója jelzi, hogy a transzkriptum és/vagy az expresszált fehérje valamilyen szerepet játszik a betegségben. Így a szekvencialistában 1. vagy 3. azonosítószámon megadott szekvenciának megfelelő mRNS, a normális-hoz képest magasabb vagy alacsonyabb szintjének kimutatása a páciensben jelzi a rák meglétét.

Valamely mintában mRNS expressziós szinteket a mintából készült expresszáltszekvencia-címkékből („expresszed sequence tags”, EST-k) álló könyvtár generálásával határozhatunk meg. Az EST-k relatív megoszlása a könyvtárban alkalmas lehet a kiindulási mintában lévő géntranszkriptumok relatív megoszlásának becslésére. A teszt EST analízisét ezután valamilyen referenciaminta EST analízisével összevetjük a kérdéses polinukleotid relatív expressziós szintjeinek megállapítása céljából.

Más típusú mRNS-analízis is elvégezhető gén-expresszió-analízis sorozat (SAGE) módszertan alapján [Velculescu és mtsai., Science 270, 484 (1995)], differenciális kimutatási módszertan szerint [például, US 5.776.683 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat], vagy a nukleotid-kölcsönhatásokon alapuló hibridizációs analízissel.

Esetleg, az összehasonlítást elvégezhetjük fehérjeszinten. A két szövetben összehasonlíthatjuk a fehérjeméreteket oly módon, hogy a két szövetből kivont fehérjék Western blotján antitesteket alkalmazunk a polipeptidek kimutatására. Expressziós szintek és sejten belüli lokalizáció immunológiai úton kimutatható a megfelelő fehérje elleni antitest alkalmazásával. További, valamely gazdából származó minta fehérjeszintjének - például a találmány szerinti polipeptid szintjének - meghatározására alkalmas eljárások a szakember számára jól ismertek. A beteg szövetben valamely polipeptid expressziójának - ugyanazon polipeptid esetében a normális szövetben tapasztaltakhoz képest - megnövekedett vagy lecsökkent szintje jelzi, hogy az expresszált fehérje a betegséggel kapcsolatban áll.

A találmány szerinti vizsgálatokban, a diagnózis megállapítható a szekvencialistában 1. vagy 3. azonosítószámon megadott szekvenciák közül legalább az egyik által kódolt géntermék expressziós szintjének kimutatásával. A beteg és a normális szövetek mRNS- vagy fehérjeszintjeinek összehasonlítása szintén alkalmazható valamely betegség előrehaladásának vagy csökkenésének nyomonkövetésére.

Polinukleotidsorok alkalmazásával egy kérdéses mintában nagyszámú polinukleotid-szekvenciák vizsgálata végezhető el. Ezeket alkalmazni lehet gének differenciális expressziójának vizsgálatára és a génfunkció meghatározására. Például, a szekvencialistában 1. és 3. azonosítószámon megadott polinukleotid-szekvenciák sorozatait alkalmazni lehet annak megállapítására, hogy normális és rákos sejtekben a polinukleotid bármelyike különbözőképpen expresszálódik-e vagy sem. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, elkészíthetjük a szekvencialistában 1. és 3. azonosítószámon megadott nukleotidszekvenciákat vagy annak fragmentumait tartalmazó oligonukleotid próbák sorát abból a célból, hogy hatékony szűrővizsgálatot, például genetikai mutációk vizsgálatát, tudjunk végezni. A „sorozat” (array) eljárások jól ismertek és általában elismertek és a molekuláris genetikában – például, többek között génexpresszió, genetikai kapcsolatok, és genetikai variabilitás – alkalmazhatók különböző kérdések felvetésére [lásd pl. Chee és mtsai., Science 274, 610-613 (1996)].

A leírás szerinti értelemben a „diagnózis” kifejezés tartalmazza valamely alany betegséggel szembeni fogékonyságának meghatározását, annak megállapítását, hogy valamely alany az adott időpontban beteg-e, és a betegséggel sújtott alany kórjóslatát is.

A találmány tárgya továbbá diagnosztikai vizsgálat elvégzésére szolgáló diagnosztikai reagenskészlet, amely az alábbiakat tartalmazza:

(a) a találmány szerinti polinukleotidot, előnyösen a szekvencialistában 1. vagy 3. azonosítószámon megadott nukleotidszekvenciát, vagy annak fragmentumát;

(b) az (a) pontban meghatározott szekvenciával komplementer nukleotidszekvenciát;

(c) a találmány szerinti polipeptidet, a polipeptid előnyösen a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia, vagy annak fragmentuma szerinti polipeptid; vagy

(d) a találmány szerinti polipeptid elleni antitest, ahol a polipeptid előnyösen a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polipeptid.

A találmány szerinti nukleotidszekvencia kromoszómális lokalizációra is hasznosítható. Valamely egyedi emberi kromoszómán lévő konkrét helyet a szekvenciával célba lehet venni, és azzal hibridizáltatni lehet. A találmány szerinti szekvenciák elhelyezkedésének feltérképezése a kromoszómákon első jelentős lépés génnel kapcsolatos betegségek és az említett szekvenciák közötti korreláció megállapítására. Miután feltérképeztük a kromoszómán a kérdéses szekvencia pontos helyét, a kromoszómán a szekvencia fizikai pozícióját korreláltathatjuk a genetikai térkép adataival. Ilyen adatokat találhatunk például McKusick publikációjában [McKusick, „Medical Inheritance in Man”, on-line elérhető a John Hopkins Egyetem, Welch Orvosi Könyvtárában (John Hopkins University Welch Medical Library)]. Az azonos kromoszómarégióra térképezett gének és betegségek közötti kapcsolatot lánc („linkage”) analízissel azonosíthatjuk

(fizikailag szomszédos gének együttes öröklődése). A cDNS- és genomi szekvenciákban lévő, (betegségben) érintett és nem érintett egyedek közötti különbségeket is meg lehet határozni.

A találmány szerinti polipeptideket, vagy azok fragmentumait, vagy az azokat expresszáló sejteket immunogénként alkalmazni lehet a találmány szerinti polipeptidekre immunspecifikus antitestek előállítására. A leírás szerinti értelemben az „immunspecifikus” kifejezés azt jelenti, hogy az antitest affinitása lényegesen nagyobb a találmány szerinti polipeptidre nézve, mint az antitestnek a technikában eddig ismert rokon polipeptidekkel szembeni affinitása.

A találmány további szempontja szerint a találmány tárgya a találmány tárgyát képező polipeptidre, vagy annak fragmentumára, a fentiekben meghatározottak szerint immunspecifikus antitest. Az antitest előnyösen monoklonális antitest.

A találmány szerinti polipeptidek elleni antitestekhez oly módon juthatunk, ha a polipeptideket vagy azok epitópjait hordozó fragmentumokat, analógokat vagy sejteket valamilyen állatnak, előnyösen embertől különböző állatnak, rutin eljárásokkal adjuk be. Monoklonális antitestek előállítására bármilyen, folyamatos sejttenyészetben előállított antitesteket biztosító eljárás alkalmazható. Ilyen például a hibridóma eljárás [Kohler és Milstein, Nature 256, 495-497 (1975)], a trióma eljárás, az emberi B-sejt hibridóma eljárás [Kozbor és mtsai., Immunology Today 4, 72 (1983)] és az EBV-hibridóma eljárás [Cole és mtsai., „Monoclonal

Antibodies and Cancer Therapy", 77-96, kiad.: Alan R. Liss, Inc. (1985)].

Egyetlen szálból álló antitestek előállítására szolgáló eljárásokat, mint amilyen például az US 4.946.778 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalomban van leírva, szintén adaptálhatunk a találmány szerinti polipeptidek elleni egyszálú antitestek előállítására. Ezenfelül, transzgénikus egér, vagy más transzgénikus szervezet, beleértve más emlősöket is, szintén alkalmazhatók humanizált antitestek expresszáására.

A fentiekben leírt antitesteket alkalmazhatjuk a polipeptidet expresszáló klónok izolálására vagy azonosítására, vagy pedig a polipeptidek affinitáskromatográfiával történő tisztítására. A találmány szerinti antitest alkalmazható rák, előnyösen petefészek- vagy vastagbélrák, autoimmun betegségek és más rokon állapotok megelőzésére vagy kezelésére.

A találmány másik szempontja szerint, a találmány tárgya eljárás immunválasz indukálására vagy modulálására valamely emlősben, amely eljárás során az emlőst a találmány szerinti polipeptid olyan mennyiségével inokuláljuk, amely elégséges a betegség tüneteinek vagy előrehaladásának enyhítésére vagy megakadályozására antitest-termelést és/vagy T-sejt immunválaszt produkálni. A találmány még további szempontja szerint, a találmány tárgya eljárás immunválasz indukálására vagy modulálására valamely emlősben, amely eljárás során a találmány szerinti polipeptidet kódoló és annak expresszióját irányító vektor útján a

polipeptidet in vivo abból a célból juttatjuk be, hogy ilyen, az állatot a betegségtől védeni képes antitest-termelést kiváltó, immunválaszt indukáljunk.

Ismert, hogy a találmány tárgya eljárás olyan abnormalis állapotok - mint például rák és autoimmun betegségek, konkrétan petefészek- és vastagbélrák - kezelésére, amelyek kapcsolatban állnak a CASB618 polipeptid aktivitásának meglétével, magasabb vagy alacsonyabb mértékű CASB618 polipeptid expresszióval.

A találmány tárgya eljárás vegyületek abból a célból történő szűrővizsgálatára, hogy azonosítsuk azokat a vegyületeket, amelyek serkentik vagy gátolják a CASB618 polipeptid funkcióját. Általában, agonistákat és antagonistákat alkalmazhatunk a fent említett betegségek ellen terápiás és megelőzési célokra. Különféle forrásokból - mint például sejtekből, sejtmentes preparátumokból, kémiai könyvtárakból, és természetes eredetű termékek keverékeiből - származó vegyületeket azonosíthatunk. Az így azonosított agonisták, antagonisták, vagy inhibitorok lehetnek a polipeptid természetes eredetű vagy módosított szubsztrátumai, ligandumai, receptorai, enzimei, stb. esetlegesen; vagy lehetnek azok szerkezeti vagy funkcionális utánzói [lásd, Coligan és mtsai., „Current Protocols in Immunology 1, 5. fej. (1991)]. Szűrővizsgálati eljárások a szakember számára ismertek. További szűrővizsgálati eljárásokat találhatunk más publikációkban [például, Benett és mtsai., J. Mol. Recogn. 8, 52-58 (1995); Johanson és mtsai., J. Biol. Chem. 270, 9459-9471 (1995)] és azok referenciáiban.

Így, a találmány tárgya eljárás a találmány szerinti polipeptid funkcióját serkentő vagy gátló vegyületek szűrővizsgálatára, amely az alábbiak bármelyike szerinti eljárást tartalmazza:

(a) megállapítjuk a vegyületjelölt kötődését a polipeptidhez (vagy a polipeptidet hordozó sejthez vagy membránhoz) vagy annak fúziósproteinjéhez oly módon, hogy a jelölt vegyületet közvetlenül vagy közvetve valamilyen jelzéssel látjuk el;

(b) megállapítjuk a vegyületjelölt kötődését a polipeptidhez (vagy a polipeptidet hordozó sejthez vagy membránhoz) vagy annak fúziósproteinjéhez valamilyen jelzett kompetitor jelenlétében;

(c) a polipeptidet hordozó sejtek vagy sejtmembránok esetében alkalmazható kimutatási rendszer segítségével megvizsgáljuk, hogy vajon a vegyületjelölt eredményez-e valamilyen, a polipeptid aktiválás vagy gátlása folytán generált jelet;

(d) keverék kialakítása céljából a vegyületjelöltet összekeverjük az 1. igénypont szerinti polipeptidet tartalmazó oldattal, mérjük a polipeptid aktivitását a keverékben, és összehasonlítjuk a keverék aktivitását valamely standardéval; vagy

(e) például ELISA rendszer alkalmazásával kimutatjuk a vegyületjelölt hatását a polipeptidet és a polipeptidet a sejtben kódoló mRNS termelődésére.

A találmány szerinti polipeptidet alkalmazni lehet, esetleg létező membránkötött vagy oldható receptorok azonosítására a technikában ismert standard receptorkötési eljárások valamelyikével. Jól ismert eljárások is alkalmazhatók a találmány szerinti polipeptid kötődésével konkuráló a találmány szerinti polipeptid agonistái és -antagonistái azonosítására, ha van ilyen.

Így, a találmány további szempontja szerint, a találmány tárgya az alábbiakat tartalmazó szűrővizsgálati reagenskészlet a találmány szerinti polipeptid agonistái, antagonistái, ligandumai, receptorai, enzimjei, stb. azonosítására; illetve olyan vegyületek kimutatására, amelyek az ilyen polipeptidek előállítását csökkentik vagy fokozzák:

- (a) a találmány szerinti polipeptid;
- (b) a találmány szerinti polipeptidet expresszálo rekombináns sejt;
- (c) a találmány szerinti polipeptidet expresszálo sejtmembrán; vagy
- (d) a találmány szerinti polipeptid elleni antitest; ahol a polipeptid előnyösen a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polipeptid.

A szakember könnyen megérti, hogy a találmány szerinti polipeptid alkalmazható valamely agonista, antagonistá vagy a polipeptidet gátló anyag szerkezet-alapú tervezésére is lehet alkalmazni az alábbi módon:

- (a) először meghatározzuk a polipeptid szerkezetét;

(b) kikövetkeztetjük valamely agonista, antagonistá, vagy inhibitor feltételezett reaktív- vagy kötő helyének(helyeinek) háromdimenziós szerkezetét;

(c) a kikövetkeztetett reaktív- vagy kötőhellyel reagáló vagy ahhoz kötődő feltehetően kötődő vegyületjelölteket szintetizálunk; és

(d) megvizsgáljuk, hogy a vegyületjelöltek valóban agonisták, antagonisták vagy inhibitorok-e.

Génterápia is alkalmazható az alanyban lévő, releváns sejtek endogén CASB618 polipeptid előállításának befolyásolására. A génterápia áttekintése céljából ld. az alábbi publikációt [„Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches”, Human Molecular Genetics, szerk.: Strachan and Read, kiad.: BIOS Scientific Publishers, Ltd. (1996)] és azt ott idézett referenciákat.

Vakcina-előállítást, általánosságban, az alábbi publikációkban írnak le [„Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach”, Pharmaceutical Biotechnology, szerk.: Powell és Newman, kiad.: Plenum Press (1995); „New Trends and Developments in Vaccines”, szerk.: Voller és mtsai., kiad.: University Park Press, Baltimore, Maryland (1978)]. Liposzómákba történő kapszulázást például az alábbi publikációban írnak le [Fullerton, 4.235.877 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalom]. Proteinek makromolekulákhoz történő konjugációja például az alábbi szabadalmak tárgyát képezi [Likhite, 4.372.945 sz. és Armor, 4.474.757 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalom].

Az egyes vakcinadózisokban a protein mennyiségét úgy választjuk meg, hogy immunprotektív válasz kiváltására elegendő mennyiségű legyen anélkül, hogy vakcinákra jellemző káros mellékhatásokat váltana ki. Ilyen mennyiség az alkalmazott specifikus antigéntől függően változik. Általában elfogadott, hogy az egyes dózisok tartalmazzanak 1-1000 μg , előnyösen 2-100 μg , legelőnyösebben 4-40 μg fehérjét. Valamely konkrét vakcina esetében optimális mennyiséget az illető személyben az antitesttiterék és más válaszok megfigyelését tartalmazó, standard vizsgálatokkal állapíthatjuk meg. Az indító vakcinálást követően, az alany 4 hét múlva rásegítő dózist kaphat.

A leírás szerinti értelemben az „izolált” kifejezés a természetes állapottól „emberi kéz által” történt változtatást jelent. Ha valamely „izolált” készítmény vagy anyag a természetben előfordul, akkor azt eredeti környezetében megváltoztattuk, vagy onnan eltávolítottuk, esetleg mindkettő. Például, valamely polinukleotid vagy polipeptid természetes körülmények között jelen van egy élő állatban, akkor az nem „izolált”, azonban az említett, a természetes állapotban vele együtt létező anyagtól elválasztott polinukleotid vagy polipeptid a leírás szerinti értelemben „izolált”.

A „polinukleotid” kifejezés általában bármilyen poliribonukleotidot vagy poli-dezoxiribonukleotidot jelent, amely lehet nem módosított RNS vagy DNS, vagy módosított RNS vagy DNS, ideértve az akár egyesszálú akár pedig kettősszálú régiókat is.

A „változat” kifejezés olyan polinukleotidot vagy polipeptidet jelent, amely különbözik a referencia-polinukleotidtól vagy -polipeptidtől, azonban lényeges tulajdonságait megtartja. Valamely polinukleotid jellemző változata nukleotidszekvenciát tekintve különbözik egy másik, referencia-polinukleotidtól. A változat nukleotidszekvenciájában történő változások a referencia-polinukleotid által kódolt polipeptid aminosav-szekvenciájához képest eltéréseket okozhatnak vagy nem okozhatnak. A referencia-szekvencia által kódolt polipeptidben történő nukleotid-cserék aminosav-szubsztitúciókat, addíciókat, deléciókat, fúziókat és csonkolásokat eredményezhetnek, ahogyan azt az alábbiakban tárgyaljuk. Valamely polipeptid jellemző változata nukleotidszekvenciát tekintve különbözik egy másik, referencia-polipeptidtől. Általában, a különbségek behatároltak, így a referencia-polipeptid és a változat aminosav-szekvenciája teljes hosszában igen hasonló, azonban sok régió tekintetében egyedi. Valamely variáns és referencia-polipeptid aminosav-szekvenciája különbözik egy vagy több szubsztitúció, addíció, deléció vagy ezek kombinációi tekintetében. Szubsztituált vagy beillesztett aminosav lehet a genetikai kód által kódolt vagy nem kódolt. Valamely polinukleotid vagy polipeptid változata lehet természetes körülmények között előforduló allélváltozat, vagy olyan változat, amelyről nem ismert, hogy természetes körülmények között előfordulna. Természetes körülmények között elő nem forduló polipeptid- és polinukleotid-változatokat

mutagenézis eljárásokkal vagy közvetlen szintézissel állíthatunk elő.

Az „azonosság” kifejezés a technikában ismertek szerint két vagy több polipeptid-szekvencia, vagy két vagy több polinukleotid-szekvencia között fennálló, a szekvenciák összehasonlításával megállapított rokonság. A technikában az „azonosság” kifejezés jelenti polipeptid- vagy polinukleotid-szekvenciák közötti szekvenciarokonság, ilyen szekvenciák füzerei („string”) közötti esetenkénti egyezés meghatározásával megállapított fokát is. Az „azonosság” és „hasonlóság” könnyen kiszámítható az ismert eljárásokkal, például minden megkötés nélkül az alábbiak alkalmazásával [„Computational Molecular Biology”, szerk.: Lesk, kiad.: Oxford University Press, New York (1988); „Biocomputing: Informatics and Genome Projects”, szerk.: Smith, kiad.: Academic Press, New York (1993); „Computer Analysis of Sequence Data”, szerk.: Griffin és Griffin, kiad.: Humana Press, New Jersey (1994); „Sequence Analysis in Molecular Biology”, szerk.: von Heinje, kiad.: Academic Press (1987); „Sequence Analysis Primer”, szerk.: Gribskov és Devereux, kiad.: M. Stockton Press, New York (1991); Carillao és Lipman, SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988)]. azonosság meghatározására szolgáló előnyös eljárásokat úgy tervezték, hogy a tesztelt szekvenciák közötti legnagyobb egyezést adják meg. Azonosság és hasonlóság megállapítására szolgáló eljárások nyilvánosan elérhető számítógépes programokkal is elvégezhetők. Két szekvencia közötti azonosság és hasonlóság megállapítására szolgáló előnyös számítógépes programok

közé tartozik - minden korlátozás nélkül - a GCG program-csomag [Devereux és mtsai., Nucl. Acid Res. 12, 387 (1984)], BALSTP, BLASTN és FASTA [Altschul és mtsai., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)]. A BLAST X program nyilvánosan elérhető az NCBI-től és más forrásokból [BLAST Manual, Altschul és mtsai., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul és mtsai., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)]. A jól ismert Smith Waterman algoritmus is alkalmazható az azonosság megállapítására.

Az előnyösen alkalmazott algoritmus a FASTA. Poli-peptid- vagy polinukleotid-szekvenciák összehasonlítására ezen algoritmus alkalmazásakor az előnyös paraméterek a következőket tartalmazzák:

Gap Penalty: 12

Gap extension penalty: 4

Word size: 2, max 6

Poli-peptid-szekvenciák más eljárások alkalmazásával végzett összehasonlításának paraméterei az alábbiakat tartalmazzák:

1) algoritmus: Needleman és Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 443-453 (1970)

Összehasonítási mátrix: Hentikoff és Hentikoff féle BLOSSUM62 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919 (1992)]

Gap Penalty: 12

Gap Length Penalty: 4

Alkalmas, e paraméterekkel működő program nyilvánosan elérhető „gap” program (Genetics Computer Group, Madison, WI). A fent említett paraméterek (+ „no penalty for end gaps”) polipeptid összehasonlításokra szolgáló alapbeállítási paraméterek.

Polinukleotid összehasonlítás előnyös paraméterei az alábbiakat tartalmazzák:

1) algoritmus: Needleman és Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 443-453 (1970)

Összehasonítási mátrix: „matches=+10, mismatch=0”

Gap Penalty: 50

Gap Length Penalty: 3

Az „azonosság” kifejezés a technikában ismertek szerint két vagy több polipeptid-szekvencia, vagy két vagy több polinukleotid-szekvencia között fennálló, a szekvenciák összehasonlításával megállapított rokonság. A technikában az „azonosság” kifejezés jelenti polipeptid- vagy polinukleotid-szekvenciák közötti szekvenciarokonság, ilyen szekvenciák füzerei („string”) közötti esetenkénti egyezés meghatározásával megállapított fokát is. Az „azonosság” és „hasonlóság” könnyen kiszámítható az ismert eljárásokkal, például minden megkötés nélkül az alábbiak alkalmazásával [„Computational Molecular Biology”, szerk.: Lesk, kiad.: Oxford University Press, New York (1988); „Biocomputing: Informatics and Genome Projects”, szerk.: Smith, kiad.: Academic Press, New York (1993); „Computer Analysis of Sequence Data”, szerk.: Griffin és Griffin, kiad.: Humana Press, New Jersey (1994); „Sequence Analysis in Molecular

Biology", szerk.: von Heinje, kiad.: Academic Press (1987); „Sequence Analysis Primer", szerk.: Gribskov és Devereux, kiad.: M. Stockton Press, New York (1991); Carillao és Lipman, SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988)]. azonosság meghatározására szolgáló előnyös eljárásokat úgy tervezték, hogy a tesztelt szekvenciák közötti legnagyobb egyezést adják meg. Azonosság és hasonlóság megállapítására szolgáló eljárások nyilvánosan elérhető számítógépes programokkal is elvégezhetők. Két szekvencia közötti azonosság és hasonlóság megállapítására szolgáló előnyös számítógépes programok közé tartozik - minden korlátozás nélkül - a GCG program-csomag [Devereux és mtsai., Nucl. Acid Res. 12, 387 (1984)], BALSTP, BLASTN és FASTA [Altschul és mtsai., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)]. A BLAST X program nyilvánosan elérhető az NCBI-től és más forrásokból [BLAST Manual, Altschul és mtsai., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul és mtsai., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)]. A jól ismert Smith Waterman algoritmus is alkalmazható az azonosság megállapítására.

Az előnyösen alkalmazott algoritmus a FASTA. Polipeptid- vagy polinukleotid-szekvenciák összehasonlítására ezen algoritmus alkalmazásakor az előnyös paraméterek a következőket tartalmazzák:

Gap Penalty: 12

Gap extension penalty: 4

Word size: 2, max 6

Polipeptid-szekvenciák más eljárások alkalmazásával végzett összehasonlításának paraméterei az alábbiakat tartalmazzák:

1) algoritmus: Needleman és Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 443-453 (1970)

Összehasonítási mátrix: Hentikoff és Hentikoff féle BLOSSUM62 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919 (1992)]

Gap Penalty: 12

Gap Length Penalty: 4

Alkalmas, e paraméterekkel működő program nyilvánosan elérhető „gap” program (Genetics Computer Group, Madison, WI). A fent említett paraméterek (+ „no penalty for end gaps”) polipeptid összehasonlításokra szolgáló alapbeállítási paraméterek.

Polinukleotid összehasonlítás előnyös paraméterei az alábbiakat tartalmazzák:

1) algoritmus: Needleman és Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 443-453 (1970)

Összehasonítási mátrix: „matches=+10, mismatch=0”

Gap Penalty: 50

Gap Length Penalty: 3

Alkalmas, e paraméterekkel működő program nyilvánosan elérhető „gap” program (Genetics Computer Group, Madison, WI). A fent említett paraméterek (+ „no penalty for end gaps”) polipeptid összehasonlításokra szolgáló alapbeállítási paraméterek.

Példaképpen, amennyiben találmány szerinti polinukleotid-szekvencia azonos a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott referenciaszekvenciával, akkor az azonosság 100%-os, de a referenciaszekvenciával összehasonlítva tartalmazhat bizonyos, egészszámú nukleotidváltoztatásokat. Ilyen változtatás lehet legalább egy nukleotid-deléció, -szubsztitúció - beleértve a tranzíciót és transzverziót - , vagy -inverzió, és ahol az említett változás lehet a referencianukleotid 3' vagy 5' végén, vagy ezen két terminális pont között bárhol a nukleotidok közt elszórva, vagy a referenciaszekvencián belül egy vagy több egymással érintkező csoportban. A nukleotidváltozások számát úgy határozzuk meg, hogy a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti nukleotidok teljes számát megszorozzuk a megfelelő azonosság (100-al osztva) numerikus százalékkal és az eredményt kivonjuk a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvenciában lévő nukleotidok teljes számával, vagy:

$$n_n \leq X_n - (x_n * y), \quad (1)$$

ahol n_n a nukleotidváltozások száma, x_n a nukleotidok teljes száma a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvenciában, és y például 70% esetén 0,70, 80% esetén 0,80, 85% esetén 0,85, 90% esetén 0,90, 95% esetén 0,95, stb., és ahol abban az esetben, ha az x_n nem egész szám, akkor y -t lefelé kerekítjük a legközelebbi egész számra az előtt, hogy azt kivonnánk x_n -ből. A szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polipeptidet kódoló polinukleotid-szekvencia megváltoztatása nonszensz,

téves értelmű („missense”) vagy leolvasási keret eltolódását okozó mutációkat hozhat létre ebben a kódoló szekvenciában és ezáltal az ilyen változást követően a polinukleotid által kódolt polipeptid megváltozását eredményezi.

Hasonlóképpen, amennyiben a találmány szerinti polipeptid-szekvencia azonos a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott referenciaszekvenciával, az azonosság 100%-os azonosságot jelent, ha a referenciaszekvenciával összehasonlítva bizonyos, egészszámú aminosav-változtatásokat tartalmaz, akkor a %-os azonosság kevesebb, mint 100%. Ilyen változtatás lehet legalább egy aminosav deléciója, szubsztitúciója - beleértve a konzervatív és nem konzervatív szubsztitúciót - , vagy inzerciója, és ahol a változtatás a referencia-polipeptid szekvenciájának aminosav vagy karboxiterminális pozícióiban vagy ezen két terminális pont között bárhol az aminosavak közt elszórva, vagy a referenciaszekvencián belül egy vagy több egymással érintkező csoportban. Egy adott %-os azonosságra vonatkozó aminosav-változtatások számát úgy határozzuk meg, hogy a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti aminosavak teljes számát megszorozzuk a megfelelő azonosság (100-al osztva) numerikus százalékával és az eredményt kivonjuk a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvenciában lévő aminosavak teljes számával, vagy:

$$n_n \leq X_n - (x_n * y), \quad (2)$$

ahol n_n az aminosav-változtatások száma, x_n az aminosavak teljes száma a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvenciában, és y például 70% esetén 0,70, 80% ese-

tén 0,80, 85% esetén 0,85, stb., és ahol abban az esetben, ha az x_n nem egész szám, akkor y -t lefelé kerekítjük a legközelebbi egész számra az előtt, hogy azt kivonnánk x_n -ből.

A leírás szerinti értelemben a „homológ” általános kifejezés, amelyet a technikában arra alkalmaznak, hogy jelezzék egy adott polinukleotid- vagy polipeptid-szekvencia valamely kérdéses szekvenciára vonatkozó nagyfokú szekvenciaazonosságot. Az ilyen azonosságot mennyiségileg is meghatározhatjuk oly módon, hogy a fentiekben leírtak szerint a szekvenciákat összehasonlítva meghatározzuk az azonosság és/vagy hasonlóság fokát. Ezen általános kifejezés jelentéskörébe tartozik az „ortológ” kifejezés is, amely azt jelenti, hogy egy kérdéses polinukleotid vagy polipeptid funkcionálisan azonos valamely más fajból származó polinukleotiddal vagy polipeptiddel, a „paralóg” kifejezés pedig az ugyanazon fajban a funkcionálisan hasonló szekvenciákat jelenti.

Az alábbiakban megadjuk a találmányhoz tartozó ábrák leírását.

1. ábra

Az 1. ábra egyeztetett normális és daganatos vastagbélminták CASB618 expressziós szintjeit mutatja be. Az értékeket ekvivalens aktinszintekben adjuk meg. (N: normális vastagbél, T: daganatos vastagbél).

2. ábra

A 2A., 2B., 2C. és 2D. ábrák normális szövetekben történő CASB618 expresszió, valós idejű PCR-rel kapott adatait tartalmazzák.

A rövidítések az alábbiak:

2A. ábra. Co: vastagbél, Ce: méhnyak, Bra: agy, Bo_Ma: csontvelő, Bl: húgyhólyag, Ao: aorta, Ad_Gl: mellékvese

2B. ábra. Ov: petefészek, Oe: nyelőcső, Ly_No: nyirokcsomó, Lu: tüdő, Li: máj, Ki: vese, Il: patkóbél, He: szív, , Fa_Tu: petevezeték

2C. ábra. Sp: lép, Sm_In: vékonybél, Sk_Mu.: vázizom, Sk: bőr, Re: végbél, Pr: prosztata, Pl: méhlepény, Pa_Thy: mellékpajzsmirigy

2D. ábra. Tr: légcső, Thy: pajzsmirigy, Te: here, St: gyomor, Spl: lép

3. ábra

A 3. ábra az *E. coli* AR120/pRIT15081, nalidixinsavval vagy anélkül készített extraktumának SDS-PAGE géljét (12,5%) mutatja be, amely gél NS1 elleni monoklonális antitesttel analizáltuk (1. csík: molekulatömeg-marker; 2. csík: *E. coli* AR120/pRIT15081 3 órás, nem indukált; 3. csík: *E. coli* AR120/pRIT15081 3 órán át indukált; 4. csík: *E. coli* AR120/pRIT15081 4,5 órás, nem indukált; 5. csík: *E. coli* AR120/pRIT15081 4,5 órán át indukált).

4. ábra

A 4. ábra SDS-PAGE gélen tisztított CASB618-at mutatja be.

(1. és 8. csík: molekulatömeg-marker; 2. csík: lizált sejttöledék; 3. csík: a 3 tisztított fehérje a dialízis előtt; 4. csík: a tisztított, dializált fehérje; 6. csík: a tisztított, dializált fehérje (pórusméret: 0,22 μ m).

Példák

1. példa

Valós idejű RT-PCR analízis

Valós idejű RT-PCR-t [Gibson, Genome Research: 6.996 (1996)] alkalmaztunk az antigénjelölt mRNS-transzkriptum abundanciának összehasonlítására a megfelelő, több páciensből származó rákos és normális vastagbéliszövetben. Ezenfelül, ezzel az eljárással a génjelölt mRNS szintjeit normál szövetmintákban is felbecsültük.

Normális és rákos vastagbélből vett, hirtelen lefagyasztott szövettani mintákból TriPure reagens (Boehringer) alkalmazásával teljes RNS-kivonatot készítettünk. Normális szövetekből származó RNS-t vagy az InVitrogen-től szereztünk be, vagy pedig hirtelen lefagyasztott szövettani mintákból extraháltuk TriPure reagens alkalmazásával. DNázal kezelt teljes RNS-ből oligo-dT mágneses gyöngyök (Dynal) segítségével poli-A+ mRNS-t tisztítottunk. A mRNS mennyiségét SybrII festék (Molecular Probes) alkalmazásával spektrofluoriméterben (VersaFluor, BioRad) határoztuk meg. Valós idejű PCR-amplifikációhoz szükséges láncindítókat a

Perkin-Elmer szoftverrel terveztük, a TaqMan amplifikációs körülményekre vonatkozó alapbeállítások alkalmazásával.

Valós idejű reakciókat standard PCR-receptek szerint állítottuk össze. Minden egyes reakcióban 2 ng tisztított RNS-t alkalmaztunk. A valós idejű detektáláshoz 1/75000 végkoncentrációjú SybrI festéket (Molecular Probes) adtunk a reakciókeverékhez. Az amplifikálás (40 ciklus) és a valós idejű detektálást, hagyományos műszerbeállítások mellett, Perkin-Elmer Biosystems PE7700 rendszerben végeztük. Ct értékeket a PE7700 szekvenciadetektor szoftverrel számítottuk ki. Minden egyes páciensből származó minta esetében két Ct értéket vettünk: a daganat Ct (CtT) és a megfelelő normális vastagbél Ct (CtN) értéket. Valós idejű PCR-rel kapott Ct értékek logaritmusai lineárisan viszonyultak a kérdéses templátról készült másolatok számához. Ahogyan a PCR-amplifikáció hatékonysága, az elterjedt kísérleti körülmények között, megközelíti az elméleti amplifikációs hatékonyságot, $2^{(CtN-CtT)}$ a relatív transzkriptumszintek becslése a két szövetben (azaz, a daganatban hányszoros a mRNS túlexpressziója). Valós idejű PCR-reakciót 23 páciensből származó szövettani mintán végeztünk. Bizonyos páciensekből származó mintákat kétszer mértük meg. A mRNS túlexpressziójának szintjét minden egyes páciensre vonatkozóan a leírtak szerint számítottuk ki. Az antigénjelölt mRNS túlexpressziójának átlagos szintjét és az antigénjelöltet túlexpresszáló páciensek arányát ebből az adatkészletből számítottuk ki. Az egyedi értékeket az ugyanazon mintában lévő aktinra vonatkoztattuk (arány) (ld. 1. ábra). Így, az

1 érték azonos aktinexpressziónak felel meg. Az eredményeket logaritmikus skálán ábrázoltuk.

Huszonnyolc különböző szövetet átfogó, 81 normális szövetmintát teszteltünk ugyanezen eljárással. Az antigénjelölt Ct értékeit összehasonlítottuk az azonos szövetminta esetében kapott, aktinra vonatkozó értékekkel. Az aktinra vonatkoztatva standardizált eredményeket a 2A-D. ábrán mutatjuk be.

CASB618-et túlexpresszálo páciensek vastagbél daganatokban (%)	A túlexpresszálas átlagos szintje vastagbél daganatokban
18/23 (78%)	125-szörös

Következtetések: a szomszédos, normális vastagbélhez képest, a CASB618 a daganatok túlnyomó részében túlexpresszáldott. Más normális szövetekben - konkrétan egy prosztatata mintában - a CASB618 kis mértékben expresszáldik.

2. példa

DNS mikromátrixok

A DNS-mikromátrixokat arra alkalmaztuk, hogy több mintában nagy géngyűjtemények mRNS expressziós profilját megvizsgáljuk. Ezen információt a valós idejű PCR-rel kapott eredmények kiegészítésére alkalmaztuk. Az eljárás génexpressziós szintek független mérését biztosítja rákos és normális szövetekben.

DNS-mikromátrixok előállítására jelenleg alkalmazott eljárások közé soroljuk például: 1) Az Affymetrix „GeneChip” sorait, amelyekben szilárd fázisú kémiai szintézissel fotolitográfikus eljárás alkalmazásával oligonukleotidokat szintetizáltak a chip felszínére, 2) DNS-pontozó (DNA spotting) eljárás, amelyben valamilyen szilárd felszínre (például üvegre), robot segítségével kis térfogatú DNS oldatot visznek fel és azon immobilizálják. A chipet mindkét esetben a kérdéses szövetből (pl. normális szövet, daganat, stb.) kivont, radioaktivitással vagy fluoreszcens riporter molekulával jelzett cDNS-sel vagy cRNS-el hibridizáltatják. A jelzett anyagot a chiphez hibridizáltatják és a chipen lévő egyes szekvenciákhoz kötődött próba mennyiségét speciális műszerrel megállapítják. A vizsgálatot be lehet állítani egyszeres fluoreszcens riporterrel (vagy radioaktivitással), vagy esetleg két fluoreszcens riporterrel is el lehet végezni. Ez utóbbi esetben, mindkét mintát külön-külön, eltérő riporter molekulával jelzik. A két jelzett mintát a DNS chipen lévő szekvenciához kompetitív hibridizáltatják. A két fluoreszcens jel arányát megméri a chipen lévő egyes szekvenciák esetében. Ezt az arányt alkalmazzák a két mintában a transzkriptum relatív elterjedésének kiszámítására. Részletes leíráshoz számos forrásból hozzájuthatunk [például, Schena, „DNS Microarrays: a practical approach”, kiad.: Oxford University Press (1999); World Wide Web, <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/index.html>, vagy

<http://arrayit.com/DNA-Microarray-Protocols/>, és a specializált terjesztők (pl. Affymetrix)].

3. példa

EST-profilok

Az antigén szövetekben történő expressziójának kísérletes jellemzését kiegészítő megközelítés az emberi „Expressed Sequence Tags” adatbázis vizsgálata. Az EST kis cDNS-fragmentumok, amelyeket valamely konkrét szövetből vagy sejtvonalból kivont mRNS-gyűjteményből állítottak össze. Jelenleg egy ilyen adatbázisban jelentős mennyiségű, néhány száz, szövetekből származó cDNS-könyvtárból - többek között különböző típusú és stádiumú tumorszövetekből - készített EST-t (10^6) adatai érhetők el. Számítógépes eszközök (BLAST) segítségével a CASB618-szekvenciával összehasonlítási keresést végeztünk abból a célból, hogy a szövetekben történő expresszióval kapcsolatban további információkhoz jussunk.

A CASB618 EST megoszlása	ATG lib azonosító	Leírás	Kategó- ria
NCBI: 1113567	882	NCI_CGAP_Co3	TC
NCBI:1224225	937	NCI_CGAP_Co2	TC
NCBI:1271870	988	NCI_CGAP_Co12	TC
NCBI:1316079	889	NCI_CGAP_Thy1	TA
NCBI:2035497	1079	NCI_CGAP_Co8	TC
NCBI:2048268	1079	NCI_CGAP_Co8	TC
NCBI:2054603	1079	NCI_CGAP_Co8	TC

NCBI:2081390	1079	NCI_CGAP_Co8	TC
NCBI:2129969	1079	NCI_CGAP_Co8	TC
NCBI:2489139	1728	Soares_Dieckgraefe_	DC
NCBI:2489206	1728	Soares_Dieckgraefe_	DC
NCBI:2600163	882	NCI_CGAP_Co3	TC
NCBI:2641414	882	NCI_CGAP_Co3	TC
NCBI:2831741	937	NCI_CGAP_Co2	TC
NCBI:2914582	910	NCI_CGAP_Pr22	NP
NCBI:3111692	1728	Soares_Dieckgraefe_	DC
NCBI:3112040	1728	Soares_Dieckgraefe_	DC
NCBI:3043263	1460	NCI_CGAP_Pan1	Tep
NCBI:3119272	1728	Soares_Dieckgraefe_	DC
NCBI:3138950	882	NCI_CGAP_Co2	TC
NCBI:3181303	1728	Soares_Dieckgraefe_	DC
NCBI:2908798	882	NCI_CGAP_Co3	TC
NCBI:2909226	937	NCI_CGAP_Co2	TC

(TC: vastagbél-daganat, Dc: beteg vastagbél, NP: normális prosztata, Tep: epitélium daganat, Ta: más típusú daganatok)

A vastagbélrákokból származó EST-k nagy aránya szerint vastagbélrák esetén az a gén egyértelműen túl-expresszálódik. Ezenfelül, más daganatok (hasnyálmirigy, pajzsmirigy) is expresszálhatják ezt a gént.

4. példa

Northern-Southern blot analízis

Különböző daganatokból és azokkal egyeztetett normális vastagbélből származó cDNS behatárolt mennyiségét

Advantage PCR-rel amplifikáltuk (lásd fent). Több, normális szövetből vett mRNS-t is amplifikáltunk az említett eljárással. Az amplifikált cDNS-t (1 µg) 1,2%-os agarózgélben elektroforetizáltuk, majd nylon membránra transzferáltuk. A membránt („AlkPhos Direct” rendszer alkalmazásával) hibridizáltattuk a jelölt TAA cDNS fragmentumának alkalmazásával előállított próbával. Northern-Southern analízissel információkat kaptunk a transzkriptum méretéről, „splice”-változatok meglétéről és a normális illetve daganatos sejtekben a transzkriptumok elterjedtségéről.

5. példa

Northern blot analízis

A standard leírások szerint készített Northern blotokban 1 µg poliA⁺ mRNS alkalmaztunk. Radioaktív próbákat a Ready-to-Go rendszer (Pharmacia) alkalmazásával állítottuk elő.

6. példa

Teljes hosszúságú cDNS-szekvencia azonosítása

A Lambda Zap II rendszer (Stratagene) alkalmazásával 5 µg, vastagbél-daganatból származó poliA⁺ mRNS-ből cDNS-könyvtárat készítettünk. A rendszerhez tartozó leírást követjük, kivéve, hogy a reverz-transzkripció lépéshez SuperscriptII (Life Technologies) enzimet alkalmaztunk. Oligo dT-vel beindított és véletlenszerűen beindított könyvtárakat készítettünk. Körülbelül $1,5 \cdot 10^6$ független fagot lemezelünk ki a könyvtár minden egyes szűréséhez. Nylon membránokra transzferál fagtelepeket „AlkPhos Direct”-el jelzett cDNS-próbákkal hibridizáltattuk. A pozi-

tív fágokat kemilumineszcenciával mutattuk ki. A pozitív fágokat az agarlemezről kimetszettük, 500 µl M pufferrel eluáltuk és génspecifikus PCR-rel hitelesítettük. Az eluált fágokat *in vivo* kivágással egyesszájú M13 bakteriofággá konvertáltuk. A bakteriofágot *E. coli*-n végzett fertőzéssel kettősszájú DNS-sé alakítottuk. A fertőzött baktériumokat kilemezeltük és a cDNS-próbával még egy újabb szűrővizsgálatot végeztünk. Pozitív bakteriális klónokból plazmid-DNS-t tisztítottunk és a DNS mindkét szálát megszekvenáltuk.

Amennyiben a teljes hosszúságú gént nem sikerült a cDNS-könyvtárból kinyerni, a hiányzó szekvenciát RACE eljárással (Marathon kit, Clontech) izoláltuk. E megközelítés során mRNS-t reverz transzkripcióval kettősszájú cDNS-sé írunk át, a cDNS végeire linkereket ligálunk és a cDNS kívánt végződését amplifikáljuk génspecifikus láncindító és az egyik linkerspecifikus oligonukleotid alkalmazásával. Marathon PCR-termékeket plazmidba (pCRII-TOPO, InVitrogen) klónoztuk és megszekvenáltuk.

A kinyert szekvencia (a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia) egy 259 aminosavat kódoló, feltételezett nyitott leolvasási keretet (a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia) tartalmaz. A származtatott fehérjeszekvenciát elküldtük a sejten belüli lokalizáció előrejelzésére szolgáló algoritmussal történő vizsgálatra (PSORT: <http://psort.nibb.ac.jp/> és TopPred: http://www.biokemi.su.se/~server/toppred2/toppred_source.html). Ugy tűnik, hogy a CASB618-nek van 4-5 transzmembrán szegmense van, azonban csak a jóslásra alkalmazott eljárás-

sok egyike jelezte a szignálszekvencia meglétét. A molekulában 3 potenciális N-glikozilációs hely található. A molekula szubcelluláris elhelyezkedése nem világos, a legvalószínűbb a plazmamembrán.

7. példa

7.1. Tumorspecifikus antigének expressziója és tisztítása

Mikrobiális gazdáiban történő expresszálat, vagy esetleg in vitro transzkripciót/transzlációt, alkalmaztunk a találmány szerinti antigén termelésére, vakcinakészítés céljára, proteínfragmentumok vagy teljes protein előállítására gyors tisztításhoz és a természetes körülmények között expresszált protein immunhisztokémiával történő jellemzésére vagy az expresszálas követő tisztításhoz szükséges antitestek előállítására.

Rekombináns proteineket két mikrobiális gazdáiban, *E. coli*-ban és élesztőben (mint például, *Saccharomyces cerevisiae* vagy *Pichia pastoris*) lehet expresszálni. Ez lehetővé teszi a konkrét antigén termeléséhez leginkább optimális expressziós rendszer kiválasztását. Általában, a rekombináns antigént *E. coli*-ban a reagens proteint élesztőben expresszálják.

Az expressziós stratégia része a rekombináns antigén primer szerkezetének megtervezése. Általában, az N-terminális végződéshez, az expresszió szintjének fokozására egy expressziós fúziós partnert (EFP) helyeznek. Az EFP tartalmazhat még az antigén immunogén tulajdonságainak modulálására alkalmas régiót és immunfúziós partnert (IFP)

is. Ezenfelül, a C-terminális végződéshez, a későbbi tisztítást elősegítő affinitás fúziós partnert (AFP) is lehet illeszteni.

Miután a rekombináns törzsek elérhetőek, a rekombináns terméket jellemezzük az expressziós szint értékelésével és a nyers extraktum viselkedésének analízisével megpróbáljuk előrejelezni a fehérje oldékonyságát.

A törzsek megfelelő tápoldaton történt felszaporítása és a rekombináns protein expressziójának indukálását követően, a teljes kivonatot SDS-PAGE-vel analizáljuk. A rekombináns proteineket a gélekben festéssel tesszük láthatóvá és specifikus antitestek alkalmazásával Western blot analízissel azonosítjuk.

Az expresszált antigének különböző változatainak összehasonlító értékelése lehetővé teszi a legígéretesebb jelölt kiválasztását. A kiválasztott antigént ezután tisztítjuk és immunológiai szempontból értékeljük.

E. coli AR120-ban végzett expresszálas

A következő konstrukciót terveztük meg és készítettük el: az N-terminális és C-terminális végén deléciókat (Δ 1-74., Δ 247-320. aminosavak) hordozó CASB618 gén N-terminális végéhez IFP-t (az influenza vírus NS1 proteinjének 1-81. N-terminális aminosavát kódoló NS1 DNS-szekvencia) aC-terminálishoz pedig hisztidinfarkat illesztettünk, és e konstrukciót pMG81 (pr PL long) vektorba klónoztuk (a szekvencialistában 4. azonosítószámon megadott szekvencia).

NS1- Met-Thr-Met

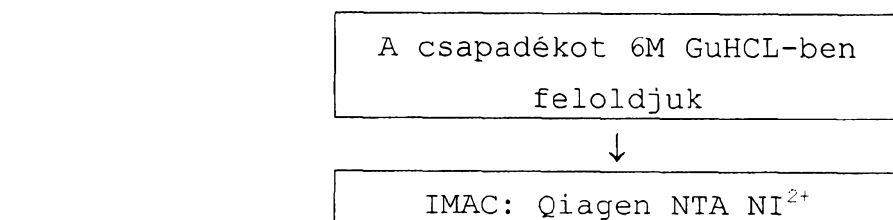
<u>C 61-8</u>	
75	246

Thr-Ser-Gly-6xHISZ

A kapott plazmidot pRIT15081-nek neveztük el. A nalidixinsavval indukálható AR120 *E. coli* gazdasejtet alkalmaztuk. Három liter *E. coli* tenyészet (LB tápoldat + kanamicin) indukálását 60 ng/ml (véggkoncentráció) nalidixinsav hozzáadásával végeztük. A tenyészetet 4 és fél órán keresztül 37°C-on inkubáltuk.

Az indukált tenyészet centrifugálását követően kapott csapadékot 60 ml PBS pufferben felszuszpendáltuk, majd ezt követően „French press” berendezésben lizáltuk. A lizátumot 20 percig 16000 g-vel centrifugáltuk. Az expresszált fehérjét a csapadékban találtuk meg (3. ábra).

A tisztítási séma a rekombináns fehérjén lévő Hisz-affinitásjelölésen alapuló klasszikus megközelítést követi. Egy jellemző kísérletben a szétroncsolt sejteket megszűrjük és a nem sejtes extraktumot Ion Metal Affinitáskromatográfiás oszlopra (IMAC; Ni²⁺ NTA, Qiagen) visszük fel, amely specifikusan visszatartja a rekombináns proteint. A visszatartott proteineket 0-500 mM imidazolgradienssel - foszfát pufferben - (lehetőleg valamilyen detergens jelenlétében) eluáljuk.

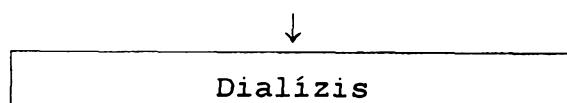
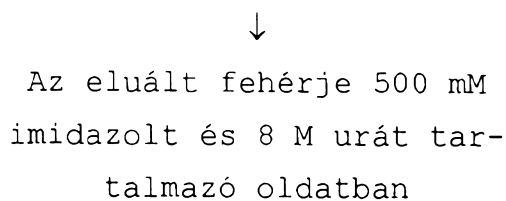


Ekvilibráció NaH_2PO_4 (100 mM, pH 8,0)
puffer: Tris (10 mM)
 NaCl (150 mM)
 GuHCl (6 M)

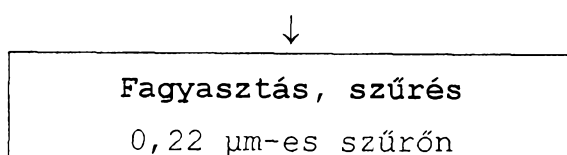
Minta: csapadék 6 M GuHCL-ben

Mosó puffer NaH_2PO_4 (100 mM, pH 6,3)
 Tris (10 mM)
 urea (8 M)

Elúciós puffer NaH_2PO_4 (100 mM, pH 4,5)
 Tris (10 mM)
 Imidazol (500 mM)
 urea (8 M)



- | | |
|--|------------------------|
| - PBS (pH 7,5) + 2% szarkozil + 6 M urea | 1 órán át |
| - PBS (pH 7,5) + 2% szarkozil + 4 M urea | 1 órán át |
| - PBS (pH 7,5) + 2% szarkozil + 2 M urea | 1 órán át |
| - PBS (pH 7,5) + 2% szarkozil + 0 M urea | 12 órán át,
4 °C-on |



A végső tisztított termék végkoncentrációját Lowry-féle fehérjeméréssel állapítottuk meg (ld. 4. ábra)

In vitro transzkripció/transzláció

A CASB618 génterméket kapcsolt *in vitro* transzkripcióval/transzlációval jellemeztük. CASB618 klón teljes szekvenciáját - *in vitro* transzkripciót lehetővé tevő - SP72 vektorba (Promega) klónoztuk. TNT T7-el kapcsolt retikulocita-lizátum (Promega cat. № L4611) alkalmazásával és S35 metionin beépítéssel végzett *in vitro* expresszióval egy 35 kd terméket mutattunk ki, amely kutyából származó pankreászból preparált mikroszómális membránok (Promega cat. № L4041) jelenlétében 30 kd méretűre csökkent. Ezen eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a jósolt, 47 aminosavból álló szignálpeptidnek megfelelő szignálpeptid processzálódik, továbbá hogy a fehérje *in vivo* membránhoz van horgonyozva vagy membránok által szekretálódik. Ezen kísérletek során a Promega által javasolt receptet követjük.

7.2. Antitesttermelés és immunhisztokémia

Kismennyiségű, viszonylag tiszta fehérjét alkalmazni lehet olyan immunológiai eszközök előállítására, amelyek arra a célra szolgálnak, hogy:

a) az expressziót normális és rákos szövetmetszetekben immunhisztokémiával kimutassuk;

b) kimutassuk az expressziót, és a tisztítási folyamat során nyomon kövessük a fehérjét (ELISA/Western blot);
vagy

c) karakterizáljuk/mennyiségileg meghatározzuk a tisztított fehérjét (ELISA).

7.2.1. Poliklonális antitestek

Immunizálás

Két-három nyulat intramuszkulárisan (I.M.) immunizáltunk 3-szor, 3 hetes időközönként 100-100 µg, 3D-MPL/QS21 adjuvánsban formulázva. Az egyes immunizálásokat követő 3 hét elteltével vérmintát vettünk és a szérumból ELISA eljárással az antitest-szintet megbecsültük. A standard leírások szerint végzett ELISA-ban burkoló antigénként a fehérjét alkalmaztuk.

ELISA

Kilencvenhat lyukú mikrolemezt (Maxisorb, Nunc) 5 µg proteinnel vontunk be 12 órán keresztül, 4°C-on végzett inkubálással. A lemezeket 1% NCS-t tartalmazó PBS-sel, 37°C-on 1 órán át telítettük, majd felvittük a nyúlszérumból készített hígítási sorozatokat, és további 1 órán át, 37°C-on inkubáltuk. A lemezeket 3-szor PBS Tween oldattal mostuk, majd nyúlelleni biotinilált antiszérumot (1/5000) (Amersham) adtunk a lyukakhoz. A lemezeket mostuk és 30 percig, 37°C-on peroxidázzal kapcsolt streptavidinnal (1/5000) inkubáltuk. Mosás után, a lyukakhoz 50-50 µl TMB-t (BioRad) adtunk és 7 perces inkubálás után a reakciót 0,2 M H₂SO₄-el állítottuk le. Az optikai denzitást (OD) 450 nm-en mértük és SoftmaxPro szoftverrel középpont-hígítási értéket számítottunk.

7.2.2. Monoklonális antitestek

Immunizálás

Öt BALB/c egeret immunizáltunk 3-szor, 3 hetes időközönként 5-5 µg tisztított fehérjével. Véreztetést a 2. injekciót követő 14 nap múlva és a 3. injekciót követő 1 hét múlva végeztünk. A szérumot ELISA eljárással teszteltük, amely során burkoló antigénként a fehérjét alkalmaztuk. Ezen eredmények alapján (középpont-hígítási érték > 1000) 1 egeret választottunk ki a fúzióra.

Fúzió/HAT szelekció

Lépsejteket standard leírás szerint, SP2/0 mielőmával fuzionáltattuk 40% PEG és 5% DMSO alkalmazásával. A sejteket azután 96 lyukú lemezekre vittük át $2,5 \cdot 10^4$ - 10^5 sejt/lyuk mennyiségben és a rezisztens klónokat HAT tápoldatban szelektáltuk ki. E hibridómák felülúszóit a specifikus antigének jelenlétére nézve teszteltük, és a pozitív klónokat két ciklusból álló limitált hígításnak vetettük alá. Két kör szűrővizsgálatot követően 3 hibridómát választottunk ki ascitestermelésre.

7.2.3. Immunhisztokémia

Amikor az antitestek elérhetőek voltak, immunfestést hajtottunk végre normális és rákos szöveteken az alábbiak meghatározására:

A találmány szerinti antigén expressziójának szintje rákban a normális szövethez viszonyítva, vagy

bizonyos, az antigént expresszáló rákos szövetek aránya,

annak meghatározása, hogy vajon más típusú rákok is expresszálják-e az antigént,

rákos szövetekben az antigént expresszáló sejtek aránya.

Szövetminta készítése

Mintavételt követően, a szövetmintát OCT vegyületben parafakorongra rögzítettük és folyékony nitrogénben (-160°C) lehűtött izopentánban hirtelen lefagyasztottuk. A fagyasztott tömböt felhasználásig -70°C -on tároltuk. Kriosztát kamrában ($-20, -30^{\circ}\text{C}$) 7-10 μm vastagságú metszeteket készítettünk.

Festés

Szövetmetszeteket 5 percre, szobahőmérsékleten szárítottunk, acetonban 10 percre, szobahőmérsékleten fixáltunk, majd 0,5% BSA-t és 5% szérumot tartalmazó PBS-ben telítettünk. Szobahőmérsékleten, 30 perc elteltével közvetlen vagy közvetett festést végeztünk antigénspecifikus antitestek alkalmazásával. Közvetlen festéssel jobb specificitást, de kevésbé intenzív festést, míg közvetett festéssel intenzívebb, de kevésbé specifikus festést kapunk.

7.3. A találmány szerinti antigénnel szembeni emberi immunválasz analízise

A találmány szerinti antigén immunológiai jelentőségét emberi T-sejtek *in vitro* indukálásával becsülhetjük fel. Az összes T-sejt limfocita és dendritikus sejt egészséges donorok (előnyösen HLA-A2 altípus) PBMC-kből (perifériális vérből származó mononukleáris sejtek) származott.

HLA-A2.1 peptidek szűrővizsgálatában HLA-A2.1/K^b transzgénikus egeret is alkalmaztunk.

Újonnan feltárt, antigénspecifikus CD8⁺ T-sejtvonalakat állítottunk elő és tartottunk fenn hetenkénti *in vitro* stimulációval. Az antigénre vagy antigéneredetű peptidekre adott válaszként, CD8 vonalak litikus aktivitását és γ -IFN termelését teszteltük standard eljárások alkalmazásával.

A CD8⁺ T-sejtvonalak előállítására két stratégiát alkalmaztunk: a peptiden alapuló megközelítést és az egész génen alapuló megközelítést. Mindkét megközelítéshez az újonnan feltárt antigén, a helyes leolvasási keretben meglévő, teljes hosszúságú cDNS-ére van szükség, amelyet vagy a megfelelő vivőrendszerbe klónozzunk, vagy pedig a HLA-t kötő fehérjék előrejelzésére alkalmazunk.

Peptiden alapuló megközelítés

A HLA-A2-t kötő peptidszekvenciákat a Parker-féle algoritmussal [Parker és mtsai., J. Immunol. 152, 163 (1994) és http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/] vagy a Rammensee eljárással [Rammensee és mtsai., Immunogenetics 41, 178-228 (1995); Rammensee és mtsai., „MHC ligands and peptide motifs” Landes Bioscience (1995), és <http://134.2.96.221/scripts/hlaserver.dll/home.htm>] jóslottuk meg. Peptideket azután a HLA-A2.1/K^b transzgénikus egér modellen szkríneltük (Vitiello és mtsai.). A jóslás során alkalmazott szekvencia az EPHB2v volt, amely szekvencia további C-terminális szekvencia-kiterjesztést hordozó EPHB2-vel azonos.

a) A jószolt, HLA_A0201 allélt kötő epitópok:

a.1) HLA-A*0201 névtelenek

Pozíció	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Rammense e-pontszám	Parker- pontszám°	Szekv. az.sz.
262	F	L	G	G	A	V	V	S	L	31	226.014	5
24	L	L	I	V	I	L	V	F	L	30	459.398	6
253	T	L	A	T	G	V	L	C	L	29		7
203	P	L	Y	G	G	L	A	L	L	28		8
149	G	L	P	D	P	V	L	Y	L	28	1107.961	9
100	G	L	L	V	G	L	E	G	I	28		10
53	W	L	V	R	V	L	L	S	L	27	226.014	11
62	F	I	G	A	E	I	V	A	V	26	101.181	12
260	C	L	F	L	G	G	A	V	V	25	105.510	13
196	V	L	L	S	T	P	A	P	L	25	134.369	14
60	S	L	F	I	G	A	E	I	V	25		15
210	L	L	T	T	G	A	F	A	L	24	210.633	16
104	G	L	E	G	I	N	I	T	L	24		17
34	L	A	A	S	F	L	L	I	L	24		18
222	F	A	L	A	S	I	S	S	V	23		19
216	F	A	L	F	G	V	F	A	L	23		20
192	L	L	S	N	V	L	L	S	T	23		21
138	Y	A	A	E	Y	A	N	A	L	23		22
33	A	L	A	A	S	F	L	L	I	23		23
31	F	L	A	L	A	A	S	F	L	23	540.469	24
21	S	V	P	L	L	I	V	I	L	23		25
174	H	L	A	G	H	Y	A	S	A	22		26

112	L T G T P V H Q L	22		27
97	A R V G L L V G L	22		28
91	S A A R V T A R V	22		29
73	S A E W F V G T V	22		30
27	V I L V F L A L A	22		31
308	A A L P D L K C I	21		32
299	I L G D P L H K Q	21		33
258	V L C L F L G G A	21		34
217	A L F G V F A L A	21		35
207	G L A L L T T G A	21		36
40	L I L P G I R G H	21	0	37
16	H A A G F S V P L	21		38
312	D L K C I T T N L	20		39
234	P L R L G S S A L	20		40
209	A L L T T G A F A	20	101.099	41
26	I V I L V F L A L	20		42
17	A A G F S V P L L	20		43
154	V L Y L A E K F T		222.964	44
244	T Q Y G A A F W W		719.848	45
185	W V A F C F W L L		122.527	46

° Ezen alszekvenciát tartalmazó molekula becsült diasszociációs félideje

a.2) HLA A02_01 dekamerek

Pozíció	szekvencia	Rammense e-pontszám	Parker- pontszám°	Szekv. az.sz.
33	A L A A S F L L I L	29		47
223	A L A S I S S V P L	26		48
111	T L T G T P V H Q L	26	458.437	49
209	A L L T T G A F A L	25		50
23	P L L I V I L V F L	25		51
272	Y V R P S A L R T L	24		52
261	L F L G G A V V S L	24		53
226	S S I S V P L C P L	24		54
58	L L S L F I G A E I	24		55
191	W L L S N V L L S T	23	291.716	56
61	L F I G A E I V A V	23		57
31	F L A L A A S F L L	23	569.949	58
16	H A A G F S V P L L	23		59
269	S L Q Y V R P S A L	22		60
258	V L C L F L G G A V	22		61
252	V T L A T G V L C L	22		62
101	L L V G L E G I N I	22		63
25	L I V I L V F L A L	22		64
24	L L I V I L V F L A	22	112.664	65
298	L I L G D P L H K Q	21		66
183	T L W V A F C F W L	21	21493.266	67
149	G L P D P V L Y L A	21		68
145	A L E K G L P D P V	21		69

96	T A R V G L L V G L	21		70
72	F S A E W F V G T V	21		71
175	L A G H Y A S A T L	20		72
148	K G L P D P V L Y L	20		73
104	G L E G I N I T L T	20		74
52	F W L V R V L L S L	20		75
21	S V P L L I V I L V	20		76
69	A V H F S A E W F V		251.039	77

° Ezen alszekvenciát tartalmazó molekula becsült diasszociációs félideje

Röviden, adjuvált, (peptiddel pulzált autológ lépsejtek hatékony lízisével történ meghatározás szerint) CD8 válasz indukálásra képtelen HLA-A2 peptiddel transzgénikus egereket immunizáltunk, és emberi rendszerben ezeket tovább analizáltuk.

Peptidekkel pulzált, emberi dendritikus sejteket (Romani és mtsai. szerint tenyésztve) CD8-cal válogatott T-sejtek serkentésére alkalmaztunk (FACS-szel). Több hetes serkentést követően, a CD8 vonalakat először peptiddel pulzált, autológ BLCL-en (EBV-B-vel transzformált sejtvonalak) teszteltük. A peptid korrekt *in vivo* processzálásának igazolására a CD8 vonalakat cDNS-sel transzfektált daganatsejteken (HLA-A2-vel transzfektált LnCaP, Skov3 vagy CAMA daganatsejtek) teszteltük.

A teljes génen alapuló megközelítés

CD8+ T-sejtvonalakat vagy génpuska alkalmazásával transzfektált dendritikus sejtekkel, retrovírussal transzdukált B7.1-el transzfektált fibroblasztokkal, rekombináns himlő- (Kim és mtsai.) vagy adenovírussal (Butterfield és mtsai.) fertőzött dendritikus sejtekkel indítottunk be és serkentettünk. Vírussal fertőzött sejtek különösen hatékonyan tudják az antigénikus peptideket bemutatni, mivel az antigén nagy mennyiségben expresszálódik, de a virális T-sejtvonalak túlszaporodásának elkerülése végett csak egyszer alkalmazhatók.

A különböző stimulációk után, a CD8+ vonalakat a fentiekben leírtak szerint cDNS-sel transzfektált daganatsejteken teszteltük. Az immunológiai bizonyítás megerősítésére meghatároztuk a peptidek specifikusságát és azonosságát.

Hivatkozások jegyzéke

- Vitiello és mtsai., (L. Sherman), J. Exp. Med. 173, 1007-1015 (1991).
- Romani és mtsai., J. Exp. Med. 180, 83-93 (1994).
- Kim és mtsai., J. Immunother. 20, 276-286 (1997).
- Butterfield és mtsai., J. Immunol. 161, 5607-5613 (1998)

Minden e leírásban idézett publikáció, minden korlátozás nélkül, ideértve a szabadalmakat és a szabadalmi iratokat, a kitanítás részét képezi, mintha minden egyes egyedi publikáció esetében specifikusan és egyedileg jeleztük volna azt, hogy azok a kitanítás részét képezik.

SZEKVENCIALISTA

(210) 1
(211) 1441
(212) DNS
(213) humán

(400) 1

aaagtaacgg	ctacagacag	tgagaaatag	tttcgctcgc	cggctagaaa	aactctgtcg	60
gtaccaaccc	cagagcggtg	agagcagccc	acctccacgc	ttccttaacg	gagaggtgca	120
ggactcagac	ttcaccagcc	cactcgggtcc	cagccttgta	cgcaaagaga	cgccaaggac	180
gcgctctccc	gcgtccaggc	agccccagct	tgctggcttg	cctgcccggc	tgctgtcagc	240
actcggccgg	cgtgcagcat	gacctgtgg	aacggcgtag	tgccctttta	ccccagccc	300
cggcatgccc	caggcttcag	cggtccactg	ctcatcgta	ttctagtgtt	tttggctcta	360
gcagcaagct	tcctgctcat	cttgccgggg	atccgtggcc	actcgcgctg	gttttggttg	420
gtgagagttc	ttctcagtct	gttcataagg	gcagaaattg	tggtgtgca	cttcagtgca	480
gaatgggttc	tggttacagt	gaacaccaac	acatcctaca	aagccttcag	cgcagcgcgc	540
gttacagccc	gtgtcgggtc	gctcgtgggc	ctggagggca	ttaatattac	actcacaggg	600
accccgagtgc	atcagctgaa	cgagaccatt	gactacaacg	agcagttcac	ctggcgctctg	660
aaagagaatt	acgccgcgga	gtacgcgaac	gcactggaga	aggggctgcc	ggacccagtg	720
ctctacctgg	cggagaagtt	cacaccgagt	agcccttgcy	gcctgtacca	ccagtaccac	780
ctggcgggac	actacgcctc	ggccacgcta	tggttggtcg	tctgcttctg	gctcctctcc	840
aacgtgctgc	tctccacgcc	ggccccgctc	tacggaggcc	tggcactgct	gaccaccgga	900
gccttcgcgc	tcttcggggg	cttcgccttg	gcctccatct	ctagcgtgcc	gctctgcccg	960
ctccgcctag	gctcctccgc	gctcaccact	cagtacggcg	ccgccttctg	ggtcacgctg	1020
gcaaccggcg	tctgtgcct	cttcctcgga	ggggccgtgg	tgagtctcca	gtatgttcgg	1080
cccagcgctc	ttcgaccctt	tctggaccaa	agcgccaagg	actgcagcca	ggagagaggg	1140
ggctcacctc	ttatcctcgg	cgacccactg	cacaagcagg	ccgctctccc	agacttaaaa	1200
tgtatcacca	ctaacctgtg	agggggaccc	aatctggact	ccttccccgc	cttgggacat	1260
cgcaggccgg	gaagcagtg	ccgccaggcc	tggggccagga	gagctccagg	aagggcactg	1320
agcgtgctg	gcgcgaggcc	tcggacatcc	gcaggcacca	gggaaagtct	cctggggcga	1380
tctgtaaata	aacctttttt	tcttttggtt	tttaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1440
a						1441

(210) 2
(211) 320
(212) PRT
(213) humán

(400) 2

Met	Thr	Leu	Trp	Asn	Gly	Val	Leu	Pro	Phe	Tyr	Pro	Gln	Pro	Arg	His
1				5					10					15	
Ala	Ala	Gly	Phe	Ser	Val	Pro	Leu	Leu	Ile	Val	Ile	Leu	Val	Phe	Leu

35000

[illegible]

(210)	3
(211)	498
(212)	DNS
(213)	humán

(400)	3						
ctctagcgtg	ccgctctgcc	cgctcccgcc	taggctcctc	cgcgctcacc	actcagtacg		60
agcgccgcct	tctgggtcac	gctggcaacc	ggcgtcctgt	gcctcttcct	cggagggggcc		120
gtggtgagtc	tccagtatgt	tcggcccagc	gctcttcgca	cccttctgga	ccaaagcgcc		180
aaggactgca	gccaggagag	agggggctca	cctcttatcc	tcggcgaccc	actgcacaag		240
caggccgctc	tcccagactt	aaaatgtatc	accactaacc	tgtgaggggg	acccaatctg		300
gactccttcc	ccgccttggg	acatcgcagg	ccgggaagca	gtgcccgcca	ggcctgggcc		360
aggagagctc	caggaaaggg	actgagcgct	gctggcgcgca	ggcctcggac	atccgcaggc		420
accagggaaa	gtctcctggg	gcgatctgta	aataaacctt	tttttctttt	gtttttttaa		480
aaaaaataaa	agtcgacc						498



- (210) 4
(211) 262
(212) PRT
(213) humán
(400) 4

Met Asp Pro Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
1 5 10 15
His Val Arg Lys Arg Val Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe
20 25 30
Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
35 40 45
Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr Arg Ala Gly Lys Gln Ile
50 55 60
Val Glu Arg Ile Leu Lys Glu Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
65 70 75 80
Met Glu Trp Phe Val Gly Thr Val Asn Thr Asn Thr Ser Tyr Lys Ala
85 90 95
Phe Ser Ala Ala Arg Val Thr Ala Arg Val Gly Leu Leu Val Gly Leu
100 105 110
Glu Gly Ile Asn Ile Thr Leu Thr Gly Thr Pro Val His Gln Leu Asn
115 120 125
Glu Thr Ile Asp Tyr Asn Glu Gln Phe Thr Trp Arg Leu Lys Glu Asn
130 135 140
Tyr Ala Ala Glu Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Gly Leu Pro Asp Pro
145 150 155 160
Val Leu Tyr Leu Ala Glu Lys Phe Thr Pro Ser Ser Pro Cys Gly Leu
165 170 175
Tyr His Gln Tyr His Leu Ala Gly His Tyr Ala Ser Ala Thr Leu Trp
180 185 190
Val Ala Phe Cys Phe Trp Leu Leu Ser Asn Val Leu Leu Ser Thr Pro
195 200 205
Ala Pro Leu Tyr Gly Gly Leu Ala Leu Leu Thr Thr Gly Ala Phe Ala
210 215 220
Leu Phe Gly Val Phe Ala Leu Ala Ser Ile Ser Ser Val Pro Leu Cys
225 230 235 240
Pro Leu Arg Leu Gly Ser Ser Ala Leu Thr Thr Gln Tyr Thr Ser Gly
245 250 255
His His His His His His
260

- (210) 5
(211) 9
(212) PRT
(213) humán
(400) 5

Phe Leu Gly Gly Ala Val Val Ser Leu

(210) 6
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 6
Leu Leu Ile Val Ile Leu Val Phe Leu
1 5

(210) 7
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 7
Thr Leu Ala Thr Gly Val Leu Cys Leu
1 5

(210) 8
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 8
Pro Leu Tyr Gly Gly Leu Ala Leu Leu
1 5

(210) 9
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 9
Gly Leu Pro Asp Pro Val Leu Tyr Leu
1 5

(210) 10
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 10
Gly Leu Leu Val Gly Leu Glu Gly Ile
1 5

(210) 11
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 11
Trp Leu Val Arg Val Leu Leu Ser Leu
1 5

(210) 12
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 12
Phe Ile Gly Ala Glu Ile Val Ala Val
1 5

(210) 13
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 13
Cys Leu Phe Leu Gly Gly Ala Val Val
1 5

(210) 14
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 14
Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Pro Leu
1 5

(210) 15
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 15
Ser Leu Phe Ile Gly Ala Glu Ile Val
1 5

(210) 16
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 16
Leu Leu Thr Thr Gly Ala Phe Ala Leu
1 5

(210) 17
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 17
Gly Leu Glu Gly Ile Asn Ile Thr Leu
1 5

(210) 18
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 18

Leu Ala Ala Ser Phe Leu Leu Ile Leu

1 5

(210) 19
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 19

Phe Ala Leu Ala Ser Ile Ser Ser Val

1 5

(210) 20
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 20

Phe Ala Leu Phe Gly Val Phe Ala Leu

1 5

(210) 21
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 21
Leu Leu Ser Asn Val Leu Leu Ser Thr
1 5

(210) 22
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 22
Tyr Ala Ala Glu Tyr Ala Asn Ala Leu
1 5

(210) 23
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 23
Ala Leu Ala Ala Ser Phe Leu Leu Ile
1 5

(210) 24
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 24

Phe Leu Ala Leu Ala Ala Ser Phe Leu

1 5

(210) 25
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 25

Ser Val Pro Leu Leu Ile Val Ile Leu

1 5

(210) 26
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 26

His Leu Ala Gly His Tyr Ala Ser Ala

1 5

(210) 27
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 27
Leu Thr Gly Thr Pro Val His Gln Leu
1 5

(210) 28
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 28
Ala Arg Val Gly Leu Leu Val Gly Leu
1 5

(210) 29
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 29
Ser Ala Ala Arg Val Thr Ala Arg Val
1 5

(210) 30

(211) 9

(212) PRT

(213) humán

(400) 30

Ser Ala Glu Trp Phe Val Gly Thr Val

1 5

(210) 31

(211) 9

(212) PRT

(213) humán

(400) 31

Val Ile Leu Val Phe Leu Ala Leu Ala

1 5

(210) 32

(211) 9

(212) PRT

(213) humán

(400) 32

Ala Ala Leu Pro Asp Leu Lys Cys Ile

1 5

(210) 33
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 33
Ile Leu Gly Asp Pro Leu His Lys Gln
1 5

(210) 34
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 34
Val Leu Cys Leu Phe Leu Gly Gly Ala
1 5

(210) 35
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 35
Ala Leu Phe Gly Val Phe Ala Leu Ala
1 5

(210) 36

(211) 9

(212) PRT

(213) humán

(400) 36

Gly Leu Ala Leu Leu Thr Thr Gly Ala

1 5

(210) 37

(211) 9

(212) PRT

(213) humán

(400) 37

Leu Ile Leu Pro Gly Ile Arg Gly His

1 5

(210) 38

(211) 9

(212) PRT

(213) humán

(400) 38

His Ala Ala Gly Phe Ser Val Pro Leu

1 5

(210) 39
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 39
Asp Leu Lys Cys Ile Thr Thr Asn Leu
1 5

(210) 40
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 40
Pro Leu Arg Leu Gly Ser Ser Ala Leu
1 5

(210) 41
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 41
Ala Leu Leu Thr Thr Gly Ala Phe Ala
1 5

(210) 42
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 42
Ile Val Ile Leu Val Phe Leu Ala Leu
1 5

(210) 43
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 43
Ala Ala Gly Phe Ser Val Pro Leu Leu
1 5

(210) 44
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 44
Val Leu Tyr Leu Ala Glu Lys Phe Thr
1 5

95003

(210) 45
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 45
Thrh Gln Tyr Gly Ala Ala Phe Trp Trp
1 5

(210) 46
(211) 9
(212) PRT
(213) humán

(400) 46
Trp Val Ala Phe Cys Phe Trp Leu Leu
1 5

(210) 47
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 47
Ala Leu Ala Ala Ser Phe Leu Leu Ile Leu
1 5 10

(210) 48
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 48
Ala Leu Ala Ser Ile Ser Ser Val Pro Leu
1 5 10

(210) 49
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 49
Thr Leu Thr Gly Thr Pro Val His Gln Leu
1 5 10

(210) 50
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 50
Ala Leu Leu Thr Thr Gly Ala Phe Ala Leu
1 5 10

(210) 51
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 51
Pro Leu Leu Ile Val Ile Leu Val Phe Leu
1 5 10

(210) 52
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 52
Tyr Val Arg Pro Ser Ala Leu Arg Thr Leu
1 5 10

(210) 53
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 53
Leu Phe Leu Gly Gly Ala Val Val Ser Leu
1 5 10

(210) 54
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 54
Ser Ile Ser Ser Val Pro Leu Cys Pro Leu
1 5 10

(210) 55
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 55
Leu Leu Ser Leu Phe Ile Gly Ala Glu Ile
1 5 10

(210) 56
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 56
Trp Leu Leu Sre Asn Val Leu Leu Ser Thr
1 5 10

(210) 57
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 57
Leu Phe Ile Gly Ala Glu Ile Val Ala Val
1 5 10

(210) 58
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 58
Phe Leu Ala Leu Ala Ala Ser Phe Leu Leu
1 5 10

(210) 59
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 59
His Ala Ala Gly Phe Ser Val Pro Leu Leu
1 5 10

(210) 60
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 60
Ser Leu Gln Tyr Val Arg Pro Ser Ala Leu
1 5 10

(210) 61
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 61
Val Leu Cys Leu Phe Leu Gly Gly Ala Val
1 5 10

(210) 62
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 62
Val Thr Leu Ala Thr Gly Val Leu Cys Leu
1 5 10

(210) 63
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 63
Leu Leu Val Gly Leu Glu Gly Ile Asn Ile
1 5 10

(210) 64
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 64
Leu Ile Val Ile Leu Val Phe Leu Ala Leu
1 5 10

(210) 65
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 65
Leu Leu Ile Val Ile Leu Val Phe Leu Ala
1 5 10

(210) 66
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 66
Leu Ile Leu Gly Asp Pro Leu His Lys Gln
1 5 10

(210) 67
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 67
Thr Leu Trp Val Ala Phe Cys Phe Trp Leu
1 5 10

(210) 68
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 68
Gly Leu Pro Asp Pro Val Leu Tyr Leu Ala
1 5 10

(210) 69
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 69

Ala Leu Glu Lys Gly Leu Pro Asp Pro Val
1 5 10

(210) 70
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 70

Thr Ala Arg Val Gly Leu Leu Val Gly Leu
1 5 10

(210) 71
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 71

Phe Ser Ala Glu Trp Phe Val Gly Thr Val
1 5 10

(210) 72
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 72
Leu Ala Gly His Tyr Ala Ser Ala Thr Leu
1 5 10

(210) 73
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 73
Lys Gly Leu Pro Asp Pro Val Leu Tyr Leu
1 5 10

(210) 74
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 74
Gly Leu Glu Gly Ile Asn Ile Thr Leu Thr
1 5 10

(210) 75
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 75
Phe Trp Leu Val Arg Val Leu Leu Ser Leu
1 5 10

(210) 76
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 76
Ser Val Pro Leu Leu Ile Val Ile Leu Val
1 5 10

(210) 77
(211) 10
(212) PRT
(213) humán

(400) 77
Ala Val His Phe Ser Ala Glu Trp Phe Val
1 5 10

Szabadalmi igénypontok

1. Izolált polipeptid, amely a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciával, a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia teljes terjedelmére nézve, legalább 70%-ban azonos aminosav-szekvenciát tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti izolált polipeptid, amelyben az aminosav-szekvencia legalább 95%-ban azonos a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciával.

3. Az 1. igénypont szerinti, a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptid.

4. A szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polipeptid.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid immunogén fragmentumát tartalmazó polipeptid, amely képes a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polipeptidet felismerő immunválasz kiváltására.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid, amely polipeptid nagyobb fúziós protein részét képezi.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti, protein-vivőanyaghoz kémiai úton konjugált polipeptid.

8. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet kódoló izolált polinukleotid.

9. Izolált polinukleotid, amely a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciával, a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia teljes terjedelmére nézve legalább 70%-ban azonos aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptidet kódoló nukleotidszekvenciát tartalmaz; vagy az izolált polinukleotiddal komplementer nukleotidszekvenciát.

10. Izolált polinukleotid, amely a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciával, a kódoló régió teljes terjedelmére nézve legalább 70%-ban azonos aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptidet kódoló nukleotidszekvenciát tartalmaz; vagy az izolált polinukleotiddal komplementer nukleotidszekvenciát.

11. Izolált polinukleotid, amely a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti nukleotidszekvenciával, a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia teljes terjedelmére nézve legalább 70%-ban azonos nukleotidszekvenciát tartalmaz; vagy az izolált polinukleotiddal komplementer nukleotidszekvenciát.

12. A 8-11. igénypontok bármelyike szerinti izolált polinukleotid, amely esetében az azonosság legalább 95%-os.

13. Izolált polinukleotid, amely az alábbiak bármelyike:

(a) a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polipeptidet kódoló nukleotidszekvenciát tartalmazó polinukleotid;

(b) a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polinukleotid;

(c) megfelelő könyvtárnak a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia, vagy annak fragmentuma szerinti szekvenciájú jelzett próbával, sztringens hibridizációs körülmények között történt szkrínelésével előállítható polinukleotid, amely polinukleotid a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti proteinhez hasonló immunogén tulajdonságú proteint kódol, vagy az izolált polinukleotiddal komplementer nukleotidszekvencia.

14. A 8-13. igénypontok bármelyike szerinti izolált polinukleotidot tartalmazó expressziós vektor.

15. A 14. igénypont szerinti expressziós vektort tartalmazó rekombináns élő mikroorganizmus.

16. A 14. igénypont szerinti expressziós vektort vagy a 8-13. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotidot tartalmazó gazdasejt.

17. Eljárás az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid előállítására azzal jellemezve, hogy a 16. igénypont szerinti gazdasejtet a polipeptid előállítására és a polipeptid tápoldatból történő kinyerésére alkalmas körülmények között tenyésztjük.

18. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet hatékony mennyiségét és gyógyászatilag elfogadott vívőanyagot tartalmazó vakcina.

19. A 8-13. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotid hatékony mennyiségét és gyógyászatilag hatékony vívőanyagot tartalmazó vakcina.

20. Hatékony mennyiségű, az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti polipeptiddel végzett *in vitro* terheléssel módosított, vagy *in vitro* genetikai úton, az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid expresszáására módosított antigénbemutató-sejteket és gyógyászatilag hatékony vivőanyagot tartalmazó vakcina.

21. A 18-20. igénypontok bármelyike szerinti vakcina, amely TH-1-et indukáló adjuvánst is tartalmaz.

22. A 21. igénypont szerinti vakcina, amelyben a TH1-et indukáló adjuváns 3D-MPL, QS21, QS21 és koleszterin keveréke, vagy CpG oligonukleotid.

23. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidre vagy immunológiai fragmentumra immunspecifikus antitest.

24. Szűrővizsgálati eljárás az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid funkcióját serkentő vagy gátló vegyületek azonosítására azzal jellemezve, hogy az eljárás az alábbiak közül egy vagy több eljárást tartalmaz:

(a) a vegyületjelölthöz közvetlenül vagy közvetetten kapcsolt jelzés segítségével megmérjük a vegyületjelölt kötődését a polipeptidhez (vagy a polipeptidet hordozó sejtekhez vagy membránokhoz) vagy annak fúziósproteinjéhez;

(b) kompetitor jelenlétében megmérjük a vegyületjelölt kötődését a polipeptidhez (vagy a polipeptidet hordozó sejtekhez vagy membránokhoz) vagy annak fúziósproteinjéhez;

(c) a polipeptidet hordozó sejtek vagy sejtmembránok vizsgálatára alkalmas kimutatási rendszerrel teszteljük, hogy vajon a vegyületjelölt eredményez-e valamilyen, a polipeptid aktiválását vagy gátlását mutató jelet;

(d) a vegyületjelöltet összekeverjük az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet tartalmazó oldattal, megmérjük a polipeptid aktivitását a keverékben, és standarddal összehasonlítjuk a keverékben mért aktivitást; vagy

(e) például ELISA vizsgálat alkalmazásával kimutatjuk a vegyületjelölt hatását a polipeptidet vagy a polipeptidet sejtekben kódoló mRNS képződésén.

25. Eljárás valamely alany kezelésére immunmegelőzéssel vagy immunterápiával azzal jellemezve, hogy az eljárásban az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti molekulával immunválaszokat indukálunk oly módon, hogy az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet vagy a 8-13. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotidot emlősfaj immunrendszeréből származó sejtekkel *in vitro* inkubálunk, és a betegség kezelése céljából ezeket az aktivált immunsejteket infúzióval visszajuttatjuk az emlősfajba.

26. A 25. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a kezelést ovárium- vagy vastagbélrák kezelésére alkalmazzuk.

27. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid agonistája vagy antagonistája.

28. Vegyület, amely:

(a) az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid agonistája vagy antagonistája;

(b) a 8-13. igénypontok bármelyike szerinti izolált polinukleotid; vagy

(c) az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet kódoló nukleotidszekvencia expresszióját moduláló nukleinsav-molekula;

terápiás célokra való alkalmazásra.

29. Eljárás a 1-5. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotid expressziójával vagy aktivitásával kapcsolatos betegség diagnosztizálására vagy betegségre való fogékonyság diagnosztizálására alanyban azzal jellemezve, hogy az alanyból származó mintát a polinukleotid jelenlétére vagy mennyiségére nézve analizáljuk.

30. Eljárás a 8-13. igénypontok bármelyike szerinti polinukleotid expressziójával vagy aktivitásával kapcsolatos betegség diagnosztizálására vagy betegségre való fogékonyság diagnosztizálására alanyban azzal jellemezve, hogy az alanyból származó mintát a polinukleotid jelenlétére vagy mennyiségére nézve analizáljuk.

31. A 29. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a betegség a vastagbél vagy az ovárium rákos megbetegedése.

32. A 30. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a betegség a vastagbél vagy az ovárium rákos megbetegedése.

33. Izolált polinukleotid, amely

(a) a szekvencialistában 3. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti nukleotidszekvenciával, a szekvencialistában 3. azonosítószámon megadott szekvencia teljes terjedelmére nézve legalább 90%-ban azonos nukleotidszekvenciát tartalmaz;

(b) a szekvencialistában 3. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polinukleotidot tartalmazó, izolált polinukleotid;

(c) a szekvencialistában 3. azonosítószámon megadott szekvencia szerinti polinukleotid.

34. A 14. igénypont szerinti expressziós vektort vagy a 15. igénypont szerinti élő mikroorganizmust tartalmazó élő vakcinakészítmény.

35. A 8-13. igénypont szerinti polinukleotid alkalmazása karcinóma kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására.

36. A 8-13. igénypont szerinti polinukleotid alkalmazása vastagbél- vagy ovárium-karcinóma kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására.

37. Az 1-7. igénypont szerinti polipeptid alkalmazása karcinóma kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására.

38. Az 1-7. igénypont szerinti polipeptid alkalmazása vastagbél- vagy ovárium-karcinóma kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

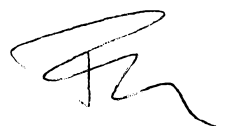


Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivőjelölt

111 oldal kérés
9 oldal rajz

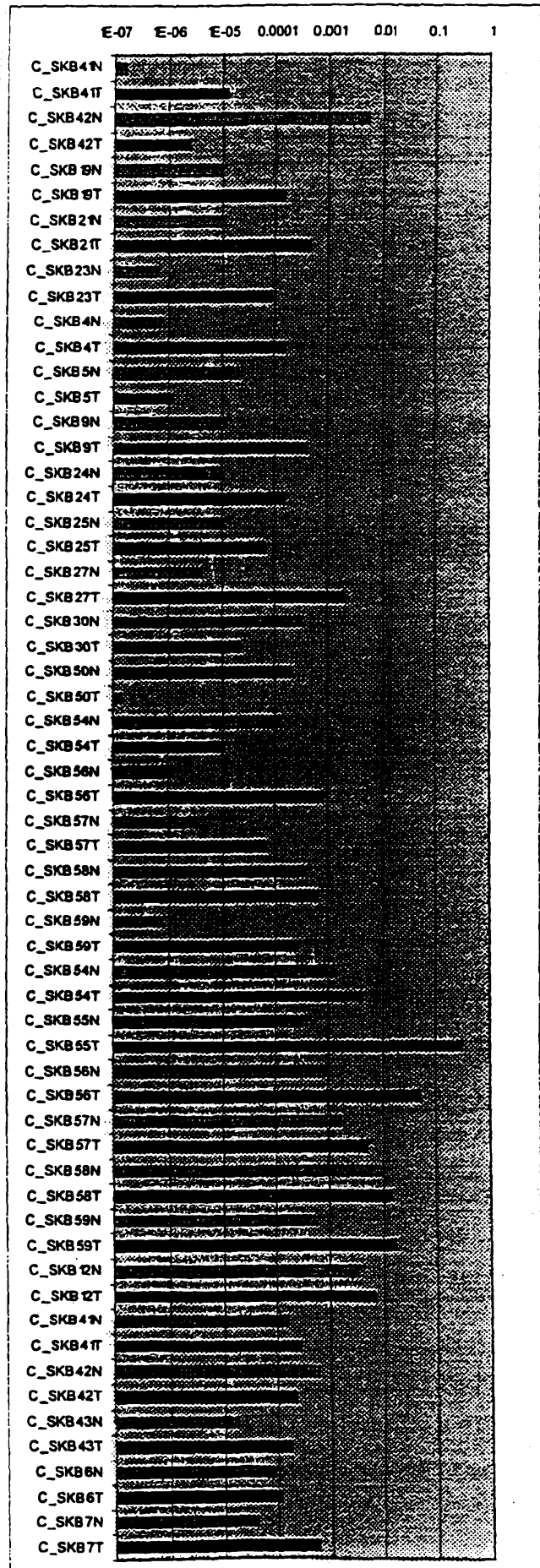
120 oldal



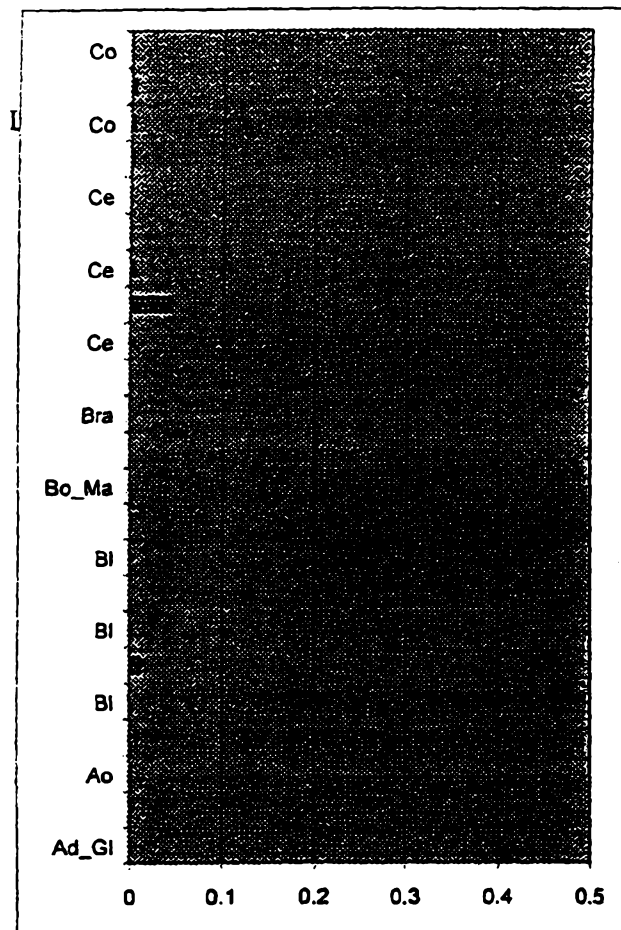
PCT/EP00/02048

1/9

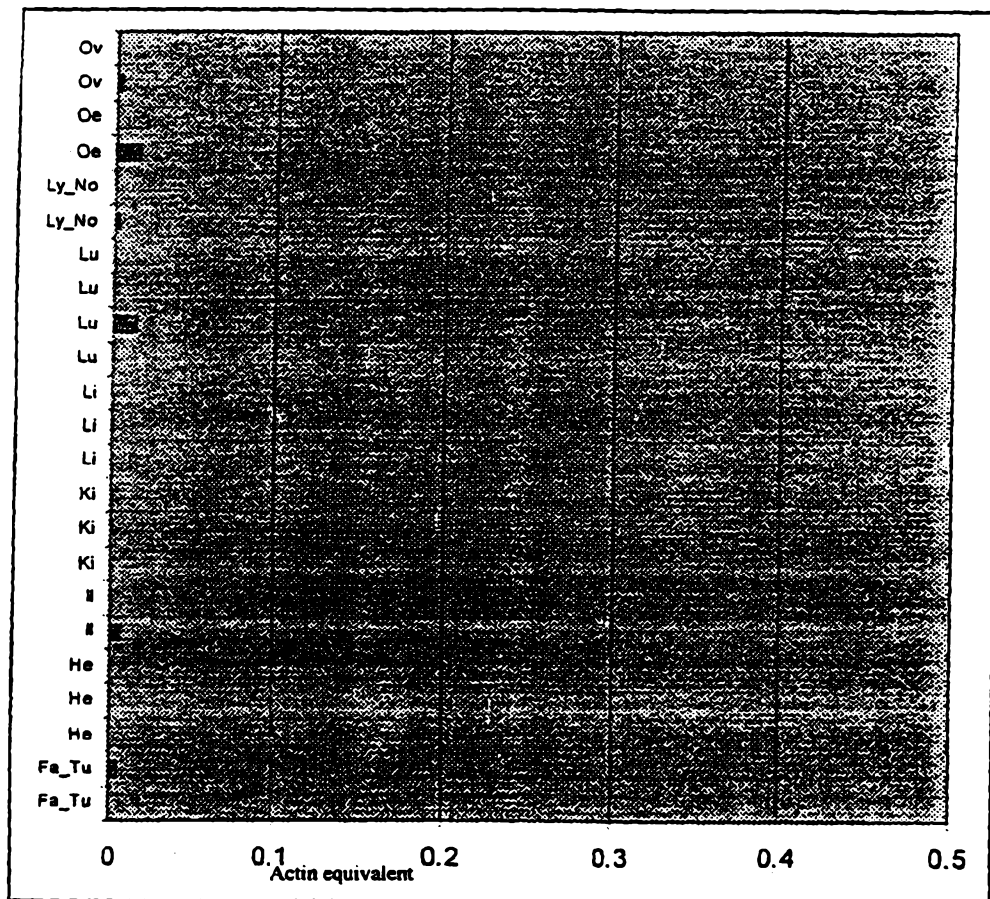
1. ábra: CASB618 expre-
sziós szintjei egyeztetett nor-
mális és daganatos minták
esetében.



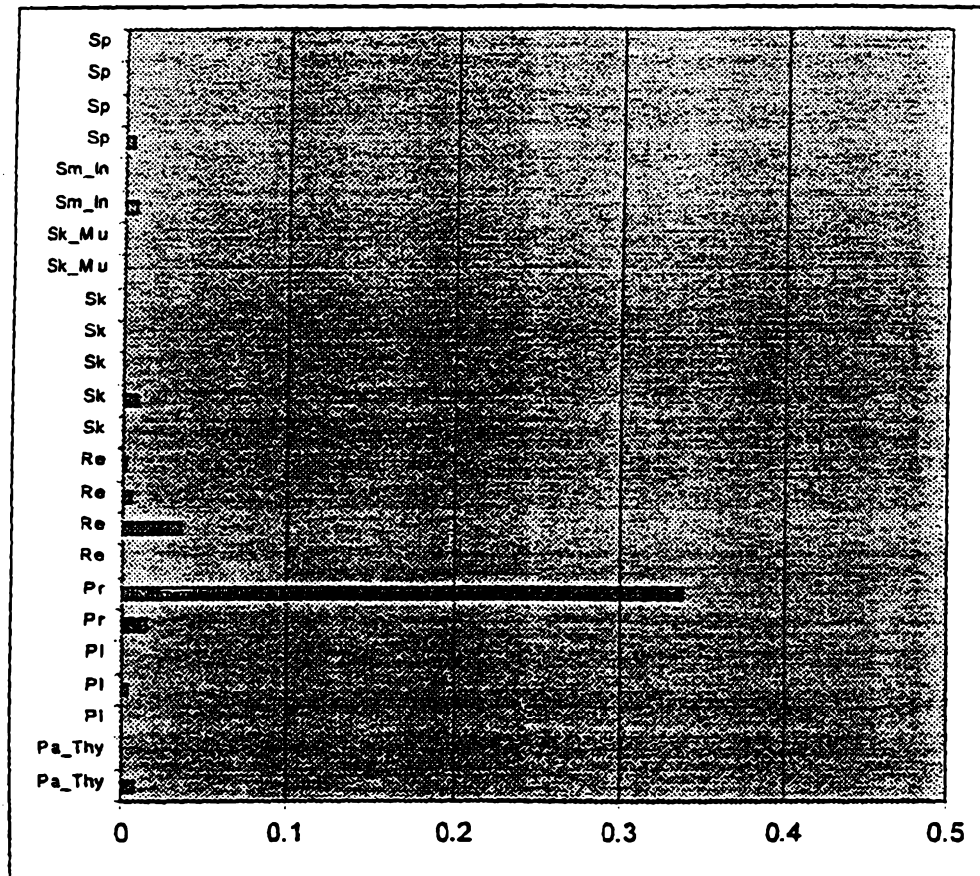
2A. ábra: CASB618 expressziója normális szövetekben. Valós idejű PCR eredmények



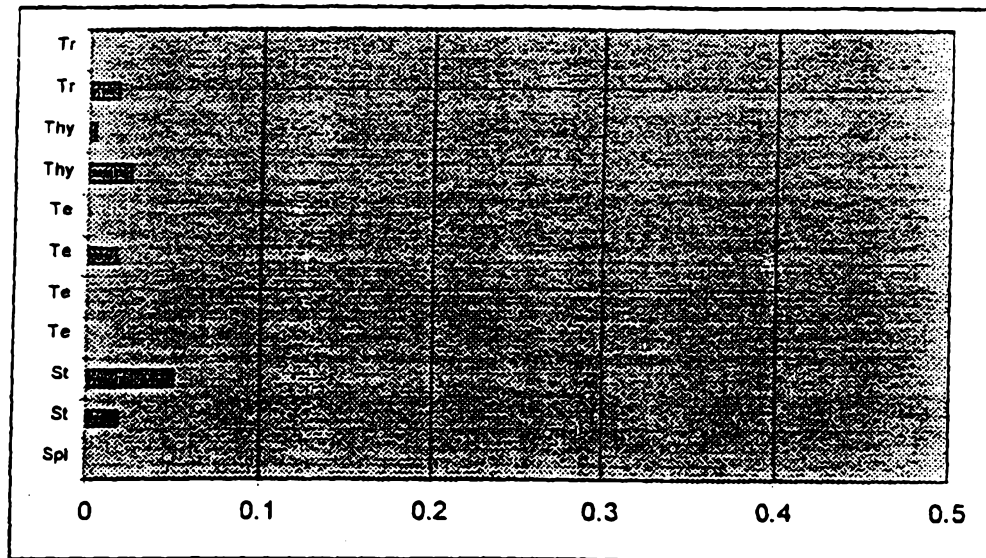
2B. ábra: CASB618 expressziója normális szövetekben. Valós idejű PCR eredmények (folytatás)



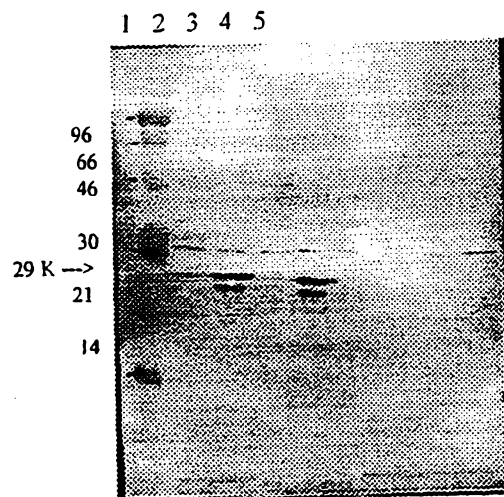
2C. ábra: CASB618 expressziója normális szövetekben. Valós idejű PCR eredmények (folytatás)



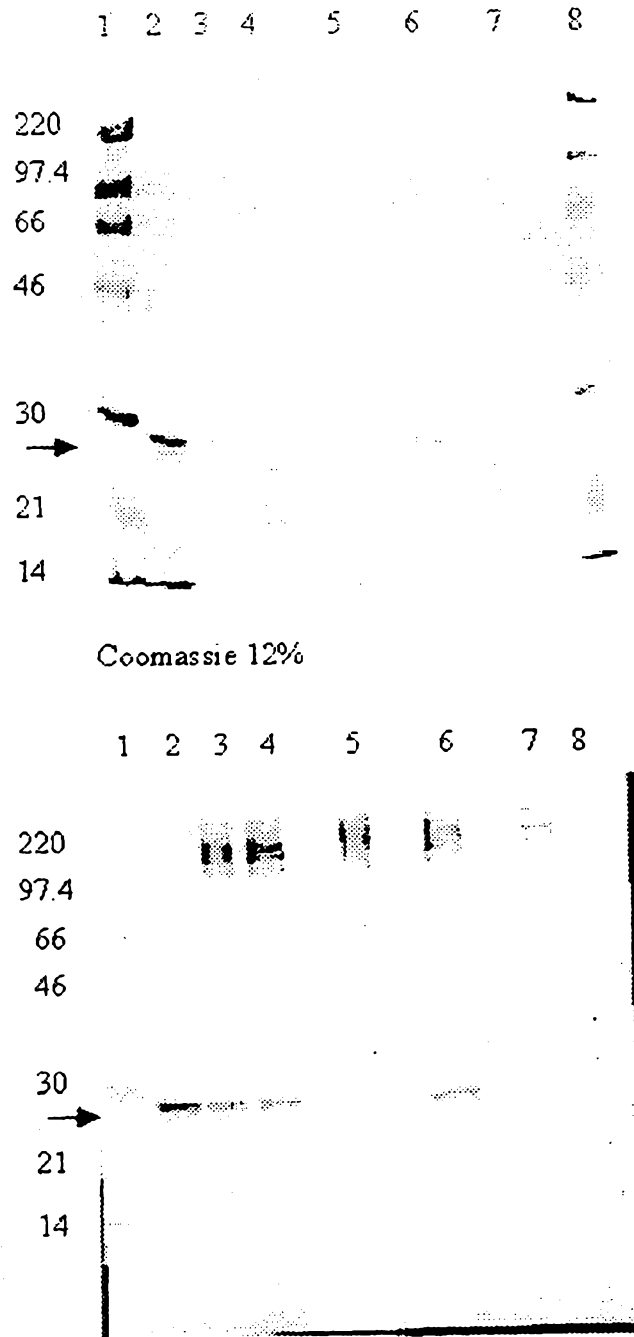
2D. ábra: CASB618 expressziója normális szövetekben. Valós idejű PCR eredmények (folytatás)



3. ábra: Az E. coli AR120/pRIT15081 kivonat SDS-PAGE
(12,5%-os) gélje.



4. ábra: A tisztított CASB618 SDS-PAGE géljei



A Western blot képet NS1 elleni monoklonális antitesttel tettük láthatóvá.

SZEKVENCIA INFORMÁCIÓK:

1. azonosítószámú szekvencia:

AAAGTAACGGCTACAGACAGTGAGAAATAGTTTCGCTCGCCGGCTAGAAAACTCTGTCCGTACCAACCCCA
 GAGCGTTGAGAGCAGCCACCTCCACGCTTCCTTAACGGAGAGGTGCAGGACTCAGACTTCACCAGCCCACT
 CGGTCCCAGCCTTGCTACGCAAAGAGACGCCAAGGACGCGCTCTCCCGCTCCAGGCAGCCCCAGCTTGCTGG
 CTTGCCTGCCCCGCTGCGTGACGACTCGGCCGGCGTGACGatgaccctgtggaacggcgctactgcctttt
 tccccccagccccggcatgccgcaggcttcagcggtccactgctcatcgttattctagtgttttggctcta
 gcagcaagcttcctgctcatcttgccggggatccgtggccactcgcgctgggttttgggtgggtgagagtcttc
 ctcaagtctgttcataggcgcagaaattgtggctgtgcacttcagtgcagaatgggtcgtgggtacagtgaac
 accaacacatcctacaaagccttcagcgcagcgcgcttacagcccgtgtcgggtctgctcgtgggcctggag
 ggcattaatattacactcacagggaccccagtgcatcagctgaacgagaccattgactacaacgagcagttc
 acctggcgtctgaaagagaattacgccgcggagtagcgcgaacgcactggagaaggggctgccggacccagt
 ctctacctggcggagaagttcacaccgagtagcccttgccggcctgtaccaccagtaccacctggcgggacac
 tagcctcgccacgctatgggtggcggtctgcttctggctcctctccaacgtgctgctctccacgccggcc
 ccgctctacggaggcctggcactgctgaccaccggagccttcgcgctcttcgggggtcttcgccttgccctcc
 atctctagcgtgccgctctgcccgtccgcctaggctcctccgcgctcaccactcagtacggcgccgcttc
 tgggtcacgctggcaaccggcgctcctgtgcctcttctcctcgaggggccgtgggtgagtctccagtatgttcgg
 cccagcgtctcttcgcaccttcttggaacaaagcgccaaggactgcagccaggagagaggggggtcacctctt
 atcctcggcgacccactgcacaagcaggccgctctcccagacttaaaatgtatcaccactaacctgtgaGGG
 GGACCCAATCTGGACTCCTTCCCCGCCTTGGGACATCGCAGGCCGGGAAGCAGTGCCCCGCCAGGCCTGGGCC
 AGGAGAGCTCCAGGAAGGGCACTGAGCGCTGCTGGCGCGAGGCCTCGGACATCCGCAGGCACCAGGGAAAGT
 CTCCTGGGGCGATCTGTAAATAAACCTTTTTTTCTTTTGTTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 A

2. azonosítószámú szekvencia:

CTCTAGCGTGCCGCTCTGCCCCTCCCGCTTAGGCTCCTCCGCGCTCACCCTCAGTACGAGCGCCGCTTC
 TGGGTCACGCTGGCAACCGGCGTCTGTGCCTCTTCTCGGAGGGGCGTGGTGAGTCTCCAGTATGTTCCG
 CCCAGCGCTCTTCGCACCTTCTGGACCAAAGCGCCAAGGACTGCAGCCAGGAGAGAGGGGGCTCACCTCTT
 ATCCTCGGCGACCCACTGCACAAGCAGGCCGCTCTCCAGACTTAAATGTATCACCCTAACCTGTGAGGG
 GGACCCAATCTGGACTCCTTCCCCGCCTTGGGACATCGCAGGCCGGGAAGCAGTGCCCCGCCAGGCCTGGGCC

3. azonosítószámú szekvencia:

MTLWNGVLPFYQPRHAAGFSVPLLVILVFLALAASFLLILPGIRGHSRWFVLVRVLLSLFIGAEIVAVHF
 SAEWFGTVNTNTSYKAFSAARVTARVGLLVGLEGINITLTGTPVHQLNETIDYNEQFTWRLKENYAAEYAN
 ALEKGLPDPVLYLAEKFTPSSPCGLYHQYHLAGHYASATLWVAFCFWLLSNVLLSTPAPLYGGLALLTTGAF
 ALFGVFALASISSVPLCPLRLGSSALTTQYGAAFWVTLATGVLCFLGGAVVSLQYVRPSALRTLDDQSAKD
 CSQERGGSPILIGDPLHKQAALPDLKCITTNL

AGGAGAGCTCCAGGAAGGGCACTGAGCGCTGCTGGCGCGAGGCCTCGGACATCCGCAGGCACCAGGGAAAGT
CTCCTGGGGCGATCTGTAAATAAACCTTTTTTCTTTGTTTTTAAAAAAAATAAAAGTCGACC

4. azonosítószámú szekvencia:

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEE
SDEALKMTMEWFVGTVNTNTSYKAFSAARVTARVGLLVGLEGINITLTGTPVHQLNETIDYNEQFTWRLKEN
YAAEYANALEKGLPDPVLYLAEKFTPSSPCGLYHQYHLAGHYASATLWVAFCFWLLSNVLLSTPAPLYGGLA
LLTTGAFALEGVFALASISSVPLCPLRLGSSALTTQYTSQHNNNNH