

P01 05303

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



A1

73.078/SZE

HER-2/NEU fúziós fehérjék

KIVONAT

A találmány tárgyát a HER-2/neu fúziós fehérjék, a Her-2/neu fúziós fehérjéket kódoló nukleinsav molekulák, a HER-2/neu fúziós fehérjéket expresszáló virális vektorok, és a HER-2/neu fúziós fehérjét és/vagy a HER-2/neu fúziós fehérjét kódoló nukleinsav molekulát tartalmazó gyógyászati készítmények (azaz például vakcinák) képezik. A találmány tárgyát képezik továbbá azok az eljárások, amikkel rákos betegségeket lehet megelőzni vagy kezelni, a HER-2/neu fehérje elleni immunválasz kiváltásával vagy fokozásával, beleértve a HER-2/neu onkogénhez kapcsolódó rosszindulatú betegségek kezelésében való felhasználását.

jellemző abra: \emptyset

Fu

P 0 1 0 5 3 0 3

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323



73.078/SZE

HER-2/NEU fúziós fehérjék

A jelen találmány tárgyát a HER-2/neu fúziós fehérjék, a Her-2/neu fúziós fehérjéket kódoló nukleinsav molekulák, a HER-2/neu fúziós fehérjéket expresszáló virális vektorok, és a HER-2/neu fúziós fehérjét és/vagy a HER-2/neu fúziós fehérjét kódoló nukleinsav molekulát tartalmazó gyógyászati készítmények (azaz például vakcinák) képezik. A jelen találmány tárgyát képezik továbbá azok az eljárások, amikkel rákos betegségeket lehet megelőzni vagy kezelni, a HER-2/neu fehérje elleni immunválasz kiváltásával vagy fokozásával, beleértve a HER-2/neu onkogénhez kapcsolódó rosszindulatú betegségek kezelésében való felhasználását.

Az igénybevett hatalmas pénzügyi és humán erőforrások ellenére a rák maradt az egyik legfőbb halálok. Például a 35-74 év közötti nőknél a rák a vezető halálok. Nőknél a mellrák a legáltalánosabb rosszindulatú megbetegedés, és a mellrák kialakulásának előfordulása nő. A becslések szerint kilenc nőből egyet ezzel a betegséggel diagnosztizálnak. A mellrák gyógyításának standard megközelítési módjai a műtéti beavatkozás, a besugárzás és kemoterápia köré csoportosultak. Ezek a megközelítési módok bizonyos rosszindulatú betegségek esetében drasztikus változásokat eredményeztek. De a mellrák a leggyakrabban gyógyíthatatlan, ha egy bizonyos stádium után diagnosztizálják. A korai diagnózis és terápia alternatív megközelítési módjaira van szükség.



A rosszindulatú megbetegedések egyik általános jellemzője a szabályozatlan növekedés. Úgy tűnik, hogy a rákos sejtek egy transzformációs folyamaton mennek át, a normális fenotípusból egy rosszindulatú fenotípusba, ami autonóm növekedésre képes. A szomatikus sejtek amplifikálódását és túlexpresszióját tekintik az egyik olyan primer eseménynek, ami a normális sejtek rosszindulatú sejtekké való transzformációját eredményezi. Az onkogén gének által kódolt rosszindulatú fenotípusos jellemzők a sejtosztódás során átadódnak a transzformálódott sejtek utódainak.

Legalább negyven, a rosszindulatú sejtekben működő, és a transzformációért felelős, vagy ahhoz kapcsolódó gént azonosítottak. Ezeket az onkogéneket különböző csoportokra osztották, géntermékük, azaz az onkogén által expresszált fehérje feltételezett funkciója vagy lokalizációja alapján.

Az onkogénekről azt gondolják, hogy a normális celluláris fiziológiában bizonyos esetekben nélkülözhetetlenek. Ebből a szempontból a HER-2/neu onkogén a a receptorszerű glikoproteinek tirozin kináz családja egyik tagjának tűnik, és nagyfokú azonosságot mutat az epidermális növekedési faktor receptorral (EGFR). A HER-2/neu feltehetőleg szerepet játszik a sejtek növekedésében és/vagy differenciálódásában. Úgy tűnik, hogy a HER-2/neu kvantitatív mechanizmusokkal rosszindulatú betegségeket indukál, amik egy lényegében normális géntermék fokozott vagy szabályozatlan expresszióját eredményezik.

A p185 glikoprotein a HER-2/neu onkogén fehérjeterméke. A HER-2/neu gén és a p185 számos különböző rákos megbetegedésben - beleértve a mell-, petefészek-, vastagbél- és prosztatát - amplifikálódik illetve túlexpresszálódik. A p185 a rosszindu-



latú transzformációhoz kapcsolódik, és megtalálható a dukális *in situ* karcinómák 50-60%-ában, az invazív emlőrákok 20-40%-ában, és a petefészekben, prosztatában, vastagbélben és tüdőben keletkező adenokarcinómák jelentős részében. A HER-2/neu expressziója közvetlenül kapcsolódik nemcsak a rosszindulatú fenotípushoz, hanem a rosszindulatú betegség agresszivitásához is. A HER-2/neu túlexpressziója korrelál mind az emlő-, mind a petefészek rákok borús diagnózisával.

A p185 egy transzmembrán fehérje, aminek a megjósolt molekulásúlya 185 kDa, azaz körülbelül 1255 aminosav hosszúságú. A p185-nek van egy körülbelül 645 aminosavból álló extracelluláris doménje (ECD), ami legalább 40%-os azonosságot mutat az EGFR-rel, egy erősen hidrofób transzmembrán doménnel és egy körülbelül 580 aminosavból álló C-terminális intracelluláris doménnel (ICD), ami legalább 80%-os azonosságot mutat az EGFR-rel.

Szükség van rákellenes vakcinákra, amik célba vehetnek egy rosszindulatú betegséget, amihez a HER-2/neu onkogén kapcsolódik, vagy olyan készítményekre és módszerekre, amik a HER-2/neu gén ellen immunválaszt keltenek, és fokozzák a már kiváltott immunválaszt.

A jelen találmány tárgyát HER-2/neu p185 fúziós fehérjék, a HER-2/neu fúziós fehérjéket kódoló nukleinsav molekulák, és a HER-2/neu fúziós fehérjéket kódoló polinukleotid szekvenciákat tartalmazó virális vektorok képezik, olyan alkalmazásokban, amik magukban foglalják melegvérű állatok immunizálását olyan rosszindulatú betegségekkel szemben, amikkel a HER-2/neu onkogén kapcsolatban áll. A jelen találmány szerinti fúziós fehérjék vagy nukleinsav molekulák olyan készítményekben lehetnek,



amik tartalmazznak egy gyógyászatiilag elfogadható hordozót vagy hígítószeret, azaz például egy olaj-a-vízben emulziót, és adott esetben tartalmazznak még egy vagy több további aktív adalékanyagot, azaz például immunserkentő anyagot, azaz például SBAS-2-t, 3D-MPL-t, QS21-et vagy a 3D-MPL és a QS21 kombinációját. A jelen találmány szerinti készítmény vakcinaként lehet hasznos, és ebben a formában használható. A fúziós fehérjéket, a nukleinsav molekulákat, virális vektorokat, a gyógyászati készítményeket és/vagy a vakcinákat beadhatjuk egy alkalommal (azaz például olyan betegeknek, akiben megnőtt a kockázata annak, hogy rosszindulatú betegségben megbetegedjen vagy újra megbetegedjen, vagy ha rosszindulatú betegséget tételeznek fel nála), vagy periodikusan (azaz például egy olyan betegnek, akiben megnőtt a kockázata annak, hogy rosszindulatú betegségben megbetegedjen vagy újra megbetegedjen, vagy ha rosszindulatú betegséget tételeznek fel nála). A jelen találmány szerinti vegyületek vagy készítmények jól használhatók egy vagy több létező tumor kezelésében, vagy a tumor előfordulásának vagy újra előfordulásának megelőzésében melegvérű állatokban, beleértve az embereket is.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá azok az eljárások, amikkel egy betegben egy rák kifejlődését meg lehet akadályozni, a HER-2/neu fehérje elleni immunválasz kiváltásával vagy erősítésével, azzal jellemezve, hogy egy betegnek egy előzőekben említett gyógyászati készítményt vagy vakcinát adunk be. A beteg szenvedhet például emlő-, petefészek-, vastagbél- vagy prosztatatarákban, amely esetekben az eljárás kezelést biztosít a betegség ellen, vagy egy ilyen betegség megnőtt kockázatának kitett beteg kezelhető profilaktikusan.



Az egyik megvalósítási mód szerint a gyógyászati készítmény vagy vakcina beadása abból áll, hogy egy melegvérű állat sejtjeit *ex vivo* transzfektáljuk a jelen találmány szerinti nukleinsav molekulával, vagy egy melegvérű állat sejtjeit *ex vivo* egy virális vektorral fertőzzük, ami tartalmaz egy jelen találmány szerinti nukleinsav molekulát, majd ezt követően a transzfektált vagy fertőzött sejteket bejuttatjuk a melegvérű állatba.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá azok az eljárások, amikkel a tumorsejteket el lehet távolítani egy biológiai mintából, ami abból áll, hogy egy biológiai mintát olyan T-sejtekkel hozunk érintkezésbe, amik specifikusan reagálnak egy HER-2/neu fúziós fehérjével, amely lépés abból áll, hogy az érintkezést olyan körülmények között hajtjuk végre, és annyi ideig, ami lehetővé teszi a fehérjét expresszáló sejtek eltávolítását a mintából. Rokon megvalósítási módok szerint módszereket biztosítunk a rák kifejlődésének megakadályozására egy betegben, ami abból áll, hogy a betegnek az előzőkben ismertetett módon kezelt biológiai mintát adunk be.

Egy másik megvalósítási mód szerint eljárásokat biztosítunk egy HER-2/neu fúziós fehérjére specifikus T-sejtek stimulálására és/vagy kiterjesztésére, azzal jellemezve, hogy a T-sejteket az alábbiak közül eggyel vagy többel hozzuk érintkezésbe: (i) egy előzőkben ismertetett fúziós fehérje; (ii) egy polinukleotid, ami egy ilyen fúziós fehérjét kódol; és/vagy (iii) egy antigént prezentáló sejt, ami ilyen fúziós fehérjét expresszál; olyan körülmények között, és annyi ideig, ami lehetővé teszi a T-sejtek stimulálását és/vagy kiterjesztését. Az előzőkben ismertetett módon készített T-sejteket tartalmazó izolált T-sejt populációkat is biztosítunk. További megvalósítási módok szerint a jelen



találmány tárgyát olyan eljárások képezik, amikkel a rák kifejlődését meg lehet akadályozni egy betegben, amik abból állnak, hogy egy betegnek hatékony mennyiséget adunk be egy előzőekben ismertetett T-sejt populációból.

Egy további megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgyát olyan eljárások képezik, amikkel a rák kifejlődését meg lehet akadályozni egy betegben, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk: a) egy betegből izolált CD4⁺ és/vagy CD8⁺ T-sejteket inkubálunk az alábbiak közül eggyel vagy többel: i) egy HER-2/neu fúziós fehérje; (ii) egy ilyen fúziós fehérjét kódoló polinukleotid; és (iii) egy ilyen fúziós fehérjét expresszáló, anti-gént prezentáló sejt; és b) egy betegnek hatékony mennyiséget adunk be az elszaporított T-sejtekből, ezzel gátolva a rák kifejlődését a betegben. Az elszaporított sejteket a betegnek való beadás előtt klónozni lehet, de nem feltétlenül szükséges.

Végezetül, a jelen találmány tárgya eljárás HER-2/neu fúziós fehérje előállítására, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk: a) egy sejtbe a HER-2/neu fúziós fehérjét kódoló polinukleotidot tartalmazó expressziós vektort juttatunk be; b) a transzfektált sejteket tenyésztjük; és c) megtisztítjuk az expresszált fehérjét. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a sejt egy CHO sejt. Egy másik előnyben részesített megvalósítási mód szerint a sejtet szuszpenzióban, szérumentes körülmények között tenyésztjük. Egy további megvalósítási mód szerint az expresszált fehérjét kétlépéses eljárással tisztítjuk, ami tartalmaz egy anioncserélő kromatográfiát Q Sepharose nagyteljesítményű oszlopokon, és egy hidrofób kromatográfiát Phenyl Sepharose 6 Fast Flow-on, alacsony helyettesítéssel.



A jelen találmány ezen és más aspektusai nyilvánvalóak lesznek az alábbi részletes leírás és a csatolt ábrák alapján. Minden említett referenciát teljes egészében referenciának tekintünk, ugyanúgy, mintha egyenként említettük volna.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leírásban említett ábrákat.

Az 1. ábrán a pFLAGCMV-1/ICD expressziós plazmid térképe látható, mérete 6,7 kilobázis.

A 2. ábrán a pFLAGCMV-1/KD expressziós plazmid térképe látható, mérete 5,7 kilobázis.

A 3. ábrán a pFLAGCMV-1/PD expressziós plazmid térképe látható, mérete 5,7 kilobázis.

A 4. ábrán az látható, hogy a HER-2/neu foszforilációs domén a táptalajba szekretálódik, és a HER-2/neu intracelluláris domén valamint a HER-2/neu kináz domén nem szekretálódik a táptalajba, a 3. példában ismertetett módon.

Az 5. ábrán a pcDNA3.1/hygro/ECD-PD expressziós vektor térképe látható, mérete 8,3 kilobázis.

A 6. ábrán az ECD-PD fúziós fehérje HEK-293 és CHO sejtekben való expressziójának eredményei láthatók, és azt mutatja, hogy a fúziós fehérje szekretálódik a táptalajba, a 4. példában ismertetett módon.

A 7. ábrán a humán HER-2/neu fehérje teljes aminosav szekvenciája látható (1. számú szekvencia).

A 8. ábrán a patkány HER-2/neu fehérje teljes aminosav szekvenciája látható (2. számú szekvencia). A kináz domén a 721-998-as aminosav régióra terjed ki.

A 9. ábrán az extracelluláris HER-2/neu fehérje aminosav szekvenciája látható (3. számú szekvencia).



A 10. ábrán a humán HER-2/neu fehérje foszforilációs doménjének (PD) aminosav szekvenciája látható (4. számú szekvencia).

A 11. ábrán a humán HER-2/neu fehérje foszforilációs doménje előnyben részesített részének (Δ PD) aminosav szekvenciája látható (5. számú szekvencia).

A 12. ábrán egy fúziós fehérje aminosav szekvenciája látható, ami tartalmazza a humán HER-2/neu fehérje extracelluláris (ECD) és foszforilációs doménjét (PD) (6. számú szekvencia).

A 13. ábrán egy fúziós fehérje aminosav szekvenciája látható, ami tartalmazza a humán HER-2/neu fehérje extracelluláris doménjét (ECD) és foszforilációs doménje előnyben részesített részét (Δ PD) (7. számú szekvencia).

A 14. ábrán a patkány HER-2/neu fehérje extracelluláris doménjének (ECD) aminosav szekvenciája látható.

A 15. ábrán a humán HER-2/neu fehérjét kódoló DNS molekula teljes hosszúságú aminosav szekvenciája látható (9. számú szekvencia). Ezt a teljes hosszúságú nukleotid szekvenciát a WO 96/30514 számú szabadalmi leírásban ismertetik, aminek a leírását a továbbiakban teljes egészében referenciának tekintjük.

A 16. ábrán a patkány HER-2/neu fehérjét kódoló DNS molekula teljes hosszúságú aminosav szekvenciája látható (10. számú szekvencia). Ezt a teljes hosszúságú nukleotid szekvenciát Bargmann és munkatársai ismertették [Bargmann és mtsai: *Nature* **319**, 226-230 (1986); GENBANK/X03362; amely publikációkat a továbbiakban teljes egészükben referenciaként kezelünk).

A 17. ábrán Herceptin emlős sejtekben vagy *Escherichia coli*-ban előállított különböző ECD-PD fúziós fehérjékhez való kötődésének ELISA esszéje látható. Az *Escherichia coli*-ban előállított fúziós fehérjék leolvasási keretben vannak egy 6 hisztidinből álló C-terminális vagy N-terminális jelöléssel (ezek neve C-His Tag és N-His Tag).

A 18. ábrán a HER-2/neu ECD-PD fúziós fehérje CHO-K1-ben szuszpenziós, szérumentes körülmények között való expressziójának összehasonlítása látható *Pichia* sejtekben való expressziójával.

A 19. ábrán az egér HER-2/neu nukleotid szekvenciája látható.

A 20. ábrán az egér HER-2/neu aminosav szekvenciája látható.

A jelen találmány tárgyát olyan vegyületek és készítmények képezik, amik képesek modulálni, előnyösen kiváltani vagy erősíteni a HER-2/neu onkogén expresszió fehérjetermék elleni immunitást, beleértve a rosszindulatú megbetegedéseket melegvérű állatokban, amikben egy amplifikált HER-2/neu gén egy rosszindulatú megbetegedéssel nem igényli, hogy a gén fehérje expressziós terméke jelen legyen a tumoron. Például a gén túlexpressziója szerepet játszhat a tumorképződés iniciálásában és korai fázisaiban, de a fehérje expressziója ezt követően csökkenhet, vagy teljesen hiányozhat. A jelen találmány arra használható, hogy egy hatékony immunválaszt kiváltson vagy erősítsen, azzal a céllal, hogy egy HER-2/neu pozitív tumort HER-2/neu negatív tumorrá alakítson át, amellett, hogy megelőzi a HER-2/neu pozitív tumorok létrejöttét, és provokálja a létező HER-2/neu pozitív tumorok regresszióját.



A leírásban az alábbi rövidítéseket használjuk: az „ECD” szakkifejezés extracelluláris domént jelent; az „ICD” szakkifejezés intracelluláris domént jelent; a „PD” szakkifejezés foszforilációs domént jelent (azaz azt a domént, ami foszforileződik), ami az intracelluláris doménben található; a „ Δ PD” szakkifejezés jelentése a foszforilációs domén fragmense, ami a foszforilációs doménben található; és a „KD” szakkifejezés jelentése a kináz domén, ami az intracelluláris doménben található. A HER-2/neu gén expressziójának termékét a továbbiakban „HER-2/neu fehérje” néven említjük, de ismert „p185” vagy „c-erbB2” néven is.

Az alábbiakban ismertetjük a leírásban használt szakkifejezések definícióját.

A „HER-2/neu ECD-ID fúziós fehérje” szakkifejezés - amit a továbbiakban „EXD-ICD” vagy „ECD-ICD fúziós fehérje” néven is említünk - jelentése egy fúziós fehérje (vagy annak fragmensei), amik tartalmazzák a HER-2/neu fehérje extracelluláris doménjét (vagy annak fragmenseit) és intracelluláris doménjét (vagy annak fragmenseit). A továbbiakban az ECD-ICD fúziós fehérje nem tartalmazza a HER-2/neu transzmembrán domén jelentős részét, és előnyösen nem tartalmazza egyik HER-2/neu transzmembrán domént sem.

A „HER-2/neu ECD-PD fúziós fehérje” szakkifejezés, amit „ECD-PD” vagy „ECD-PD fúziós fehérje”, vagy „HER-2/neu ECD Δ PD fúziós fehérje” néven is ismerünk, de említik „ECD- Δ PD” vagy „ECD- Δ PD fúziós fehérje” néven is, olyan fúziós fehérjéket (vagy azok fragmenseit) jelenti, amik tartalmazzák a HER-2/neu fehérjének egy extracelluláris doménjét (vagy annak fragmenseit) és egy foszforilációs doménjét (vagy annak fragmenseit, azaz például a Δ PD-t). Az ECD-PD és az ECD- Δ PD fúziós fehérjék nem



tartalmazzák a HER-2/neu transzmembrán domén jelentős részét, és előnyösen nem tartalmazzák egyik HER-2/neu transzmembrán domént sem.

A „HER-2/neu ECD-ICD fúziós fehérje” és a „HER-2/neu ECD-PD fúziós fehérje” szakkifejezésről és az ezekkel rokon szakkifejezésekről ismert, hogy jelentik ezek fragmenseit, homológjait és funkcionális fragmenseit is (ezeket a továbbiakban „variánsok” néven említjük), azaz azokat, amikbe egy vagy több aminosavat beszúrtak, amikből egy vagy több aminosavat kivágtak, vagy egy vagy több aminosavat helyettesítettek más aminosavakkal vagy nem-aminosavakkal, amik a jelen találmány egy előnyben részesített megvalósítási módja szerint vagy i) fokozzák egy immunválasz beindítását vagy erősítését a HER-2/neu fehérjével összehasonlítva, vagy ii) a HER-2/neu fehérjével összehasonlítva nem érintik lényegesen egy immunválasz beindítását vagy erősítését (azaz a variáns stimulálja segítő T-sejtek vagy citotoxikus T-sejtek válaszát, vagy serkenti ellenanyagok képződését). A variánsok specifikus, nem-korlátozó példái közé tartoznak a HER-2/neu ECD-ID fúziós fehérje és a HER-2/neu ECD-PD fúziós fehérje példaként megadott fragmensei, homológjai és funkcionális ekvivalensei, amiket az alábbiakban részletesen ismertetünk. A variánsok lehetnek „lényegében azonosak” vagy „lényegében hasonlóak” egy természetes komponenseket tartalmazó fúziós fehérjéhez, és megtartják annak az immunválaszt stimuláló képességét.

A „fúziós fehérje” szakkifejezés jelentése olyan fehérje, ami legalább két, kovalens kötéssel összekötött polipeptidből áll, és amiben az egyik polipeptid egy fehérjeszekvenciából vagy doménből származik, míg a másik polipeptid egy másik fehérjeszekven-



ciából vagy doménből származik. A polipeptideket vagy közvetlenül vagy egy kovalens linkeren - azaz például aminosav linkeren, azaz például poliglicin linkeren vagy egy másik típusú kémiai linkeren, például szénhidrát linkeren, lipid linkeren, zsírsav linkeren, poliéter linkeren (PEG, stb.) – keresztül kapcsolhatjuk [Hermanson: Bioconjugate techniques (1996)]. A fúziós fehérjét képező polipeptidek tipikus esetben C-terminális az N-terminálishoz módon kapcsolódnak, bár kapcsolódhatnak C-terminális a C-terminálishoz, N-terminális az N-terminálishoz vagy N-terminális a C-terminálishoz módon is. A fúziós fehérje polipeptidjeinek bármilyen sorrendje lehet. A „fúziós fehérje” szakkifejezés jelenti még a fúziós fehérjét képező polipeptidek konzervatív módon módosított variánsait, polimorf variánsait, alléljeit, mutánsait, alszekvenciáit és interspeciesz homológjait. A fúziós fehérjék előállíthatók úgy, hogy az egyik fehérjeszekvenciából származó aminosav láncot kovalens kötéssel kapcsoljuk egy másik fehérjeszekvencia aminosav láncához, például úgy, hogy a fúziós fehérjét egybefüggően kódoló rekombináns polipeptidet készítünk. A fúziós fehérjék 2,3,4 vagy több, azonos, vagy különböző fajból származó különböző aminosav láncot tartalmazhatnak. Egy fúziós fehérjében az aminosavak különböző láncai egymáshoz illeszthetők közvetlenül, vagy közvetve is egymáshoz illeszthetők egy kémiai csoporton keresztül, vagy egy aminosav kapcsoló csoporton keresztül. A fúziós fehérje adott esetben tartalmazhat más komponenseket is, amint azt az alábbiakban részletesen ismertetjük.

A „fehérje” szakkifejezést a továbbiakban mind „polipeptid”, mind „peptid” jelölésre is használjuk.



A „nukleinsav” szakkifejezés jelentése dezoxiribonukleotid vagy ribonukleotid, valamint azok polimerjei, egyszálú vagy kétszálú formában. A szakkifejezés olyan nukleinsavakra vonatkozik, amik ismert nukleotid analógokat vagy módosított gerincstruktúrákat vagy kötéseket tartalmaznak, amik szintetikus, természetes vagy nem természetes eredetűek, amiknek a kötési tulajdonságai hasonlítanak a referencia nukleinsav kötési tulajdonságaira, és amik a referencia nukleotidokhoz hasonlóan metabolizálódnak. Ilyen analógok lehetnek például, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a foszforotioátok, a foszforamiditek, a kiral-metil foszfónátok, a 2-O-metil ribonukleotidok és a peptid-nukleinsavak (PNS-ek).

Hacsak külön nem jelezzük, akkor egy adott nukleinsav szekvencia implicite jelenti annak konzervatív módon módosított variánsait (azaz például a degenerált kodonok használatát) és komplementer szekvenciáit, és az explicite jelzett szekvenciát is. Pontosabban, a degenerált kodonhelyettesítés úgy érhető el, hogy olyan szekvenciákat generálunk, amikben egy vagy több (vagy az összes) kodon harmadik pozíciója kevert bázisokkal és/vagy dezoxiinozin csoportokkal van helyettesítve [Batzer és mtsai: *Nucleic Acids Research* **19**, 5081 (1991); Ohtsuka és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* **260**, 2605-2608 (1985); Rossolini és mtsai: *Molecular & Cellular Probes* **8**, 91-98 (1994)]. A nukleinsav szakkifejezést használjuk még génre, cDNS-re, mRNS-re, oligonukleotidra és polinukleotidra.

A találmány szerinti fúziós fehérjét tartalmazó polinukleotid szekvencia szigorú körülmények között hibridizálódik mindegyik nukleotid szekvenciához, amik a fúziós fehérjében levő egyes polipeptideket kódolják. A fúziós polipeptid egyes polipeptidjeit kó-



doló polinukleotid szekvenciák lehetnek tehát konzervatív módosított variánsok, polimorf variánsok, allélek, mutánsok, alszekvenciák és interspeciesz homológok.

A „százalékos szekvencia azonosságot” úgy állapítjuk meg, hogy két optimálisan illesztett szekvenciát egy összehasonlító ablakban összehasonlítunk, aholis az összehasonlító ablakban levő polinukleotid szekvencia rész a referencia szekvenciával (ami nem tartalmaz addíciókat vagy deléciókat) összehasonlítva tartalmazhat addíciókat vagy deléciókat (azaz réseket), hogy a két szekvenciát optimálisan egymáshoz tudjuk illeszteni. A százalékot úgy számítjuk ki, hogy meghatározzuk azoknak a pozícióknak a számát, amikben mindkét szekvenciában azonos nukleotid bázis vagy aminosav csoport található, ezzel megkapjuk az illeszkedő pozíciók számát, és az illeszkedő pozíciók számát osztjuk az összehasonlító ablakban levő pozíciók teljes számával, majd az eredményt 100-zal szorozva kapjuk a szekvencia-azonosság százalékát.

A polinukleotid szekvenciákra vonatkozó „lényegében azonos” szakkifejezés azt jelenti, hogy egy szekvencia legalább 25%-ban azonos egy másikkal. Egy másik változat szerint a százalékos azonosság bármilyen egész szám lehet 25 és 100% között. Az inkább előnyben részesített megvalósítási módok szerint egy referencia szekvenciával összehasonlítva az azonosság legalább 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% vagy 99% vagy még ennél is magasabb, az itt ismertetett program használatával; ez előnyösen a BLAST, az alábbiakban ismertetett standard paramétereket használva. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy ezeket az értékeket hozzáigazíthatjuk két nukleotid szekvencia által



kódolt fehérjék megfelelő azonosságának meghatározásához, figyelembe véve a kodon degeneráltságát, az aminosavak hasonlóságát, a leolvasási keret pozicionálását és hasonlókat. Ezekre a célokra az aminosav szekvenciák „lényegi azonossága” legalább 40%-os szekvencia azonosságot jelent. A polipeptidek előnyben részesített százalékos azonossága 40 és 100% között bármilyen egész szám lehet. Még előnyösebb megvalósítási módok szerint az azonosság legalább 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% vagy 99% lehet. Azok a polipeptidek, amik „lényegében hasonlóak”, közös szekvenciákat tartalmaznak, amint azt az előzőkben megjegyeztük, azzal az eltéréssel, hogy azok a csoport pozíciók, amik nem azonosak, konzervatív aminosav cserékkel eltérhetnek. A konzervatív aminosav helyettesítések a hasonló oldalláncokkal rendelkező csoportok felcserélhetőségére utalnak. Például az aminosavak egy csoportja alifás oldalláncokkal rendelkezik, ezek a glicin, az alanin, a valin, a leucin és az izoleucin; az aminosavak egy csoportja alifás-hidroxi oldallánccal rendelkezik, ide tartozik a szerin és a treonin; az aminosavak egy csoportja amidot tartalmazó oldallánccal rendelkezik, ide tartozik az aszparagin és a glutamin; az aminosavak egy csoportja aromás oldallánccal rendelkezik, ide tartozik a fenilalanin, a tirozin és a triptofán; az aminosavak egy csoportja bázikus oldallánccal rendelkezik, ide tartozik a lizin, az arginin és a hisztidin; és az aminosavak egy csoportja kéntartalmú oldallánccal rendelkezik, ide tartozik a cisztein és a metionin. Az előnyben részesített konzervatív aminosav helyettesítések közé az alábbiak tartoznak: valin-leucin-izoleucin, fenilalanin-tirozin, lizin-arginin, alanin-valin, aszparaginsav-glutaminsav és aszparagin-glutamin.



Az összehasonlításhoz a szekvenciák optimális illesztését különböző algoritmusokkal hajthatjuk végre, ezek közé tartozik Smith és Waterman lokális azonossági algoritmus [Smith és Waterman: *Add. APL. Math.* 2, 482 (1981)], Needleman és Wunsch azonosság illesztési algoritmus [Needleman és Wunsch: *Journal of Molecular Biology* 48, 443 (1970)], Pearson és Lipman hasonlóságot kereső módszerével [Pearson és Lipman: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85, 2444 (1988)], ezeknek az algoritmusoknak a számítógépes implementációjával (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA és TFASTA a Wisconsin Genetics Software Package-ben, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) vagy szemrevételezéssel.

A százalékok szekvencia-azonosság és szekvencia hasonlóság meghatározására megfelelő algoritmusok előnyben részesített példája az Altschul és munkatársai által leírt BLAST és a BLAST 2.0 algoritmus [Altschul és mtsai: *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402 (1977); Altschul és mtsai: *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410 (1990)]. A BLAST-ot és a BLAST 2.0-t az itt ismertetett paraméterekkel arra használjuk, hogy meghatározzuk a jelen találmány szerinti nukleinsavak és fehérjék százalékos szekvencia azonosságát. A BLAST elemzések elvégzéséhez a szoftver bárki számára hozzáférhető a National Center for Biotechnology Information-ön keresztül:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

A kumulatív értékeket a nukleotid szekvenciák esetében az M (jutalomérték egy illeszkedő párért; mindig >0) és N (büntetés a nem illeszkedő csoportokért; mindig <0) használatával számítjuk ki. Az aminosav szekvenciáknál egy értékelő mátrixot használ-



lunk a kumulatív érték kiszámításához. A szótalálatok kiterjesztését mindegyik irányban leállítjuk, ha: a kumulatív illeszkedési érték X értékkel kiesik az elért maximális értékéből; a kumulatív érték nullára, vagy az alá csökken, egy vagy több negatív értékű csoport-illeszkedés akkumulálódása miatt; vagy elértük valamelyik szekvencia végét. A BLAST algoritmus W , T és X paraméterei meghatározzák az illesztés érzékenységét és sebességét. A BLASTN program (nukleotid szekvenciákhoz) alap beállításnál 11-es szó-hosszúságot (W), 10-es elvárást (E), $M=5$, $N=-4$, és a két szál összehasonlítását használja. Az aminosav szekvenciákhoz a BLASTP program alap beállításnál 3-as szó-hosszúságot, 10-es elvárást és a BLOSUM62 értékelő mátrix [Henikoff és Henikoff: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 89, 10915 (1989)], 50-es illeszkedést (B), 10-es elvárást, $M=5$, $N=-4$, és a két szál összehasonlítását használja.

Annak egy másik jelzése, hogy a nukleotid szekvenciák lényegében azonosak, ha a két molekula egymáshoz, vagy egy harmadik nukleinsavhoz hibridizálódik, közepesen, vagy előnyösen szigorú körülmények között. A szigorú körülmények szekvenciafüggők, és különböző körülmények között eltérőek. A hosszabb szekvenciák specifikusan hibridizálódnak magasabb hőmérsékleten. A nukleinsavak hibridizálásának egy alapos vezérfonala megtalálható a szakirodalomban [Tijssen: Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hibridization with Nucleic Probes, „Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993)]. A szigorú körülményeket általában úgy választjuk meg, hogy a hőmérséklete körülbelül $5-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ -szal legyen alacsonyabb mint az adott szekvencia termális olvadáspontja (T_m) adott ionerősségnél és pH-nál. A T_m az a hőmér-



séklet (meghatározott ionerősségnél és pH-nál), aminél a megcélzott szekvencia hibridizál egy tökéletesen illeszkedő próbához. Tipikus esetben azokat tartjuk szigorú körülményeknek, amiknél a sókoncentráció kevesebb mint körülbelül 1,0 mol/l nátriumion, tipikus esetben 0,01-1,0 mol/l nátriumion (vagy más sók) koncentráció pH=7,0-8,3 között, és a hőmérséklet legalább 30 °C a rövid próbákhoz (azaz 10-50 nukleotid hosszú próbák), és legalább 66 °C a hosszú próbákhoz (azaz több mint 50 nukleotidot tartalmazó próbák). A szigorú körülményeket úgy is elérhetjük, ha destabilizáló ágenseket, azaz például formamidot adunk hozzá. A szelektív vagy specifikus hibridizációhoz egy pozitív jel legalább kétszerese a háttérnek, előnyösen tízszerese a háttér hibridizációnak.

A szigorú hibridizációs körülmények például az alábbiak lehetnek: 50% formamid, 5xSSC és 1% SDS, 42 °C-on inkubálva, vagy, 5X SSC, 1% SDS, 65 °C-on inkubálva, 0,2X SSC, 0,1% SDS oldattal mosva 65 °C-on.

A jelen találmány céljaira a megfelelő „közepesen szigorú körülmények” közé tartozik például az előmosás 5X SSC, 0,5% SDS, 1,0 mmol/l EDTA (pH=8,0) oldatban, hibridizálás 50-65 °C-on, 5X SSC-ben, éjszakán át, majd mosás kétszer, 65 °C-on, 20 °C-on, 2X, 0,5X és 0,2X SSC-vel (ami 0,1% SDS-t tartalmaz). Az ekkor hibridizálódó szekvenciák is a jelen találmány oltalmi körébe tartoznak.

A „T-sejtek szaporodása” szakkifejezés jelentése az alábbiakban ismertetve, magában foglalja a T-sejtek szaporodását, valamint a T-sejteknek a szaporodáshoz vezető stimulálását, azaz azoknak az eseményeknek az iniciálását, amik a mitózishoz ve-



zetnek, valamint a mitózist magát. A T-sejtek szaporodásának ki-
mutatását az alábbiakban tárgyaljuk.

A találmány szerinti fúziós fehérjék

A. A HER-2/neu fehérje intra- és extracelluláris doménjei

A HER-2/neu fehérjét választottuk célpontként rákellenes vakcinákhoz, a HER-2/neu-val előzőekben ismertetett megfigyelések alapján. Ennek a megközelítési módnak az egyik fő akadálya az elegendő mennyiségű HER-2/neu fehérje izolálása. Ennek a problémának a megoldására tett egyik kísérlet az, ha az ECD-t és az ICD külön expresszáljuk emlős sejtekben. A magas szinten szekretált fehérje formájában expresszálódó ECD fehérjét, azaz körülbelül 20 mg ECD fehérjét egyliteres egér sejttenyészetből izoláltuk. Azonban az ICD expressziója alacsony volt, azaz csak körülbelül 0,2 mg ICD fehérjét tudtunk tisztítani egy liter HEK-293 sejtekből. Emellett, a kapott ICD fehérje nagyon labilisnak bizonyult a sejtlizátumban, ezzel számos váratlan problémát okozva használható mennyiségek tisztításakor.

Amint azt az előzőekben tárgyaltuk, a HER-2/neu egy saját onkogén fehérje, és a saját fehérjék elleni immunológiai tolerancia elnyomhatja az immunválaszt. Bármilyen fehérje különböző részei elleni immunológiai tolerancia szintje függhet attól, hogy a fehérje expresszált része a sejtmembránnal együtt, vagy anélkül marad. Az ECD a sejt felszínen marad és onnan leválik. Ezzel szemben az ICD és annak részei a sejtben maradnak, és nem válnak ki. Az ECD könnyen érintkezésbe lép a test immunrendszerével, míg az ICD és annak részei viszonylag el vannak választva a test immunrendszerétől. Ennek eredményeképpen az



ECD elleni immun-tolerancia nagyobb, mint a HER-2/neu fehérje ICD része ellen. Tehát a jelen találmány szerinti vakcinákhoz az ICD fehérje és az ICD peptidek, valamint ezek variánsai, beleértve a PD fehérjét és a PD peptideket, viszonylag nagyobb immunválaszt generálnak mint az ECD fehérje és az ECD peptidek. Bár az ICD és variánsai sokkal immunogénebbek mint az ECD és variánsai, az ECD és variánsai elleni ellenanyagok jótékony hatásúak és valószínűleg kívánatosak. Az ECD a sejt felszínén található, míg az ICD és részei nem szekretálódnak, hanem a sejt belsejében maradnak. Tehát az ECD elleni ellenanyag reakciónak nagyobb lehet a terápiás hatása, és ezért a jelen találmányban előnyösebb a használata. Az ECD önmagában nem túl immunogén. Mivel az ICD (beleértve a PD-t és a Δ PD-t is) immunogénebb mint az ECD, ezért az ECD-ICD fúziós fehérje és/vagy az ECD-PD fúziós fehérje sokkal immunogénebb mint az ECD önmagában. Az ECD-IC fúziós fehérje és/vagy az ECD-PD fúziós fehérje várhatóan sokkal hatékonyabban indukál ellenanyag választ az ECD ellen, mint az ECD önmagában, ezért a jelen találmány egy előnyös megvalósítási módja.

A jelen találmányban az ECD-t vagy variánsait kombináljuk, kapcsoljuk vagy fuzionáltatjuk (közvetlenül vagy közvetve) az ICD-val vagy variánsaival, előnyösen a PD-vel vagy variánsaival. Az ECD biztosítja a strukturális konformációt azoknak az ellenanyagoknak az indukálásához, amik a HER-2/neu fehérjével a sejt felszínén reagálnak, míg az ICD vagy a PD fokozza az ECD immunogenitását. A kombináció meglepő módon sokkal hatékonyabban indukál ECD elleni immunválaszt, mint az ECD önmagában.



Az ECD-t vagy az ECD részeit kombinálhatjuk az ICD-vel vagy variánsaival, beleértve az ICD részeit is, vagy a PD-vel vagy variánsaival, beleértve a PD részeit (azaz például az Δ PD-t). A jelen találmány szerinti ECD előnyösen humán, patkány vagy egér ECD. A humán ECD-t a 9. ábrán mutatjuk be, ez a 13. számú szekvencia. A patkány ECD-t a 14. ábrán mutatjuk be, ez a 8. számú szekvencia.

A jelen találmány szerinti ICD előnyösen humán, patkány vagy egér ICD. A humán ICD-t a 7. ábrán mutatjuk be, ez az 1. számú szekvencia, ami tartalmazza a 676-os (Lys) – 1255-ös (Val) régiót. A patkány ICD-t a 8. ábrán mutatjuk be (2. számú szekvencia), ami tartalmazza a 677-es (Lys) – 1256-os (Val) régiót.

A jelen találmány szerinti PD előnyösen humán, patkány vagy egér PD. A humán PD-t a 10. ábrán mutatjuk be (4. számú szekvencia). A humán PD lehet a humán Δ PD, amit a 11. ábrán mutatunk be (5. számú szekvencia). A patkány PD-t a 8. ábrán mutatjuk be (2. számú szekvencia), beleértve a 991-es (Gln) – 1256-os (Val) régiót. A patkány PD lehet a patkány Δ PD, amit a 8. ábrán mutatunk be (2. számú szekvencia), ami tartalmazza a 991-es (Gln) – 1049-es (Arg) régiót.

Az egyik megvalósítási mód szerint a humán ECD fúzionálható (i) egy humán ICD-vel vagy patkány ICD-vel, vagy (ii) egy humán PD-vel vagy Δ PD-vel, vagy patkány PD-vel vagy Δ PD-vel. Egy másik megvalósítási mód szerint egy patkány ECD fúzionálható (i) egy humán ICD-vel vagy egy patkány ICD-vel, vagy (ii) egy humán PD-vel vagy Δ PD-vel, vagy patkány PD-vel vagy Δ PD-vel.

A HER-2/neu PD 268 aminosavat tartalmaz, intracelluláris, és a tirozin kináz fehérje foszforilezheti. Ez a régió nem mutat



azonosságot más tirozin kináz receptorok megfelelő részével. Tehát ennek a doménnek a specifitása és egyedisége különösen előnyössé teszi tumor vakcinaként való felhasználáshoz. Azonban ennek a doménnek az önmagában való expressziója baktériumokban és emlős sejtekben problematikus. A kapott PD például nagyon labilis, és nem alkalmazás nagy mennyiségben való előállításra. Az egyik megvalósítási mód szerint ez a találmány megoldja az ilyen problémákat, az intracelluláris domént vagy a foszforilációs domént, vagy azoknak egy részét fúzionáltatva a HER-2/neu extracelluláris doménnel, vagy annak egy részével. A jelen találmány szerinti ECD-ICD fúziós fehérjék és az ECD-PD fúziós fehérjék oldhatók, szekretálódnak és a tenyésztés körülmények között stabilak. Ez a rendszer képes nagymennyiségű intracelluláris domént vagy foszforilációs domént biztosítani a rákellenes vakcina kifejlesztéséhez, előnyösen az emlőrák elleni vakcina kifejlesztéséhez, de jól használható bármilyen, a HER-2/neu expresszió által jellemzett rákok elleni vakcinákban. Amellett, hogy lehetővé teszi az intracelluláris doménnek vagy a foszforilációs doménnek, vagy ezek variánsainak az extracelluláris doménnel vagy annak variánsaival képzett fúziós fehérje formájában való expresszióját, az ECD-ICD és ECD-PD fúziós fehérjék javított vakcina készítményt biztosítanak.

A PD-t úgy szekretáltatjuk, hogy a PD N-terminálisa elé egy szekréción szignál szekvenciát építünk be, ezzel egy oldható, szekretált rekombináns fehérjét kapunk. A szekréción folyamatot részesítjük előnyben, mivel ezáltal a rekombináns fehérjék a táptalajban akkumulálódnak. Mivel a fehérje nem kapcsolódik az intracelluláris fehérjékhez, a proteolízis korlátozott. A fehérjét egyszerűbben és gazdaságosabban lehet tisztítani.



Amint azt a 3. példában ismertetjük, a pFLAGCMV-1 expressziós plazmidot (Kodak) használjuk annak meghatározására, hogy a HER-2/neu intracelluláris doménnek melyik régiója szekretálható. A fehérjét fúziós fehérje formájában expresszáltatjuk, egy preprotripszin szekréción szignállal, és FLAG-Tag-gal az N-terminálisukon. A HEK-293 sejteket transzfektáljuk az ilyen konstrukciókkal, majd a sejteket és a táptalajt Western blottal (FLAG-Tag M2 ellenanyagot használva próbaként) megvizsgáljuk, van-e bennük FLAG-Tag fúziós fehérje. Az eredményeket a 4. ábrán mutatjuk be, ezek azt demonstrálják, hogy se a teljes hosszúságú ICD, se a teljes hosszúságú KD nem szekretálódik, viszont a PD oldható, szekretálódik és kimutatható a tenyésztő táptalajban. Az eredmények azt mutatják, hogy a teljes hosszúságú ICD vagy KD struktúrfehérjék nem eredményeznek szekréción, azaz a fehérjének a sejtmembránon való keresztülhatolását.

Amint azt a 4. példában ismertetjük, mivel az ECD-nek van egy szekréción szignálszekvenciája, és expresszáltatható szekréción fehérje formájában, az ECD-t használjuk fúziós partnerként a PD-hez. Az ECD-PD fúziós fehérjét HEK-293 sejtekben expresszáltatjuk. Az oldható ECD-PD fúziós fehérje szekréciónját ELISA esszével vizsgáljuk meg, HER-2/neu ECD-specifikus ellenanyagokkal, majd Western blottot végzünk HER-2/neu PD-specifikus ellenanyagokkal. Amint azt a 6. ábrán bemutatjuk, az oldható ECD-PD expresszálódik a HEK-293 sejtekben és szekretálódik a tenyésztő táptalajba.

B. A jelen találmány szerinti fúziós fehérjék immunogenitása



Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya egy fúziós fehérje, ami a HER-2/neu gén fehérje-expressziós terméke különböző részeire alapul (azaz például a HER-2/neu ECD-ICD fúziós fehérje vagy a HER-2/neu ECD-PD fúziós fehérje), és ami képes ellenanyag választ kelteni, és a csecsemőmirigy-dependens limfociták („T-sejtek”) felismerik. Ennek megfelelően az autochton immun T-sejt választ használhatjuk profilaktikusan, vagy olyan rosszindulatú betegségek kezelésére, amikben a HER-2/neu túlexpresszálódik vagy túlexpresszálódott. Más szempontból a jelen találmány tárgya olyan nukleinsav molekulák használata, amik az immunizáláshoz az ilyen ECD-ICD fúziós fehérjék vagy ECD-PD fúziós fehérjék, vagy azok variánsai expresszióját vezérlik, önmagukban, vagy egy virális vektorban.

Általánosságban a CD4⁺ T-sejt populációkat úgy tekintjük, hogy segítőként vagy indukálószerként működnek a limfokinek felszabadulása során, ha egy specifikus antigénnel stimuláljuk; azonban a CD4⁺ sejtek egy alcsoportja képes citotoxikus T-limfocitákként (CTL) működni. Hasonlóképpen, a CD8⁺ T-sejteket úgy tekintjük, hogy úgy működnek, hogy közvetlenül lizálják az antigén célpontokat; azonban számos különböző körülmény mellett képesek limfokineket szekretálni, hogy segítők vagy DTH funkciót biztosítsanak. Az átfedő funkciók potenciálja ellenére a fenotípusos CD4 és CD8 markerek kapcsolva vannak az I-es vagy II-es típusú MHC antigénekhez kötött peptidekkel való felismerés miatt. Az I-es vagy II-es MHC osztály kontextusában az antigén felismerése felhatalmazza a CD4⁺ vagy CD8⁺ T-sejteket, hogy válaszoljanak a különböző antigénekre, vagy ugyanarra az antigénre, ami különböző körülmények között van prezentálva. Az



immunogén peptidek II-es osztályú MHC antigénekhez való kötése leginkább olyan antigének esetében fordul elő, amiket az antigént prezentáló sejtek megemésztettek.

Amint azt a jelen találmányban tárgyaljuk, a HER-2/neu onkogén fehérje expressziós termékének egy ECD-ICD fúziós fehérjéjét vagy egy ECD-PD fúziós fehérjéjét a T-sejtek felismerik. A keringésben levő HER-2/neu ECD-ICD fúziós fehérje vagy HER-2/neu ECD-PD fúziós fehérje peptid fragmensekre degradálódik. Az ECD-ICD fúziós fehérjéből vagy az ECD-PD fúziós fehérjéből származó peptidfragmensek kötődnek a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) antigénekhez. Egy MHC antigénhez kötött peptidnek a sejt felszínén való bemutatásával, és a peptid plusz a saját MHC antigén kombinációjának a gazdaszervezet T-sejtjei által való felismerésével a HER-2/neu ECD-ICD vagy a HER-2/neu ECD-PD fúziós fehérje (beleértve a rosszindulatú sejt által expresszáltakat is) immunogén a T-sejtekre. A T-sejt receptor tökéletes specifitása lehetővé teszi az egyes T-sejtek számára, hogy különbséget tegyenek azok között a fehérje fragmensek között, amik egyetlen aminosav csoportban térnek el egymástól.

Az ECD-ICD fúziós fehérjéből vagy az ECD-PD fúziós fehérjéből származó peptidfragmensre adott immunválaszban a peptid-MHC komplexhez nagy affinitással kötődő T-sejt receptort expresszáló T-sejtek kötődnek a peptid-MHC komplexhez, és ezáltal aktiválódnak, és szaporodásra indukálódnak. Egy peptiddel való első találkozás alkalmával kisszámú immun T-sejt szekretál limfokineket, szaporodik és differenciálódik effektor- és memória T-sejtekké. A primer immunválasz *in vivo* jön létre, de nehéz *in vitro* kimutatni. Ha a memória T-sejtek újra találkoznak ugyanazzal az antigénnel, akkor ez gyorsabb és intenzívebb im-



munválaszt eredményez. A szekunder immunválasz vagy *in vitro* vagy *in vivo* lép fel. Az *in vitro* választ könnyen mérhetjük, ha mérjük a szaporodás mértékét, a citokin termelés mértékét, vagy az antigénnel újra érintkezésbe került T-sejt populáció citolitikus aktivitásának generálását. A T-sejt populációnak egy adott antigénnel adott válaszként való jelentős szaporodása jelzi az antigénnel való korábbi érintkezést, vagy az azzal való feltöltődést.

C. A jelen találmány szerinti fúziós fehérjék

Az egyik megvalósítási mód szerint a jelen találmány szerinti vegyületek HER-2/neu ECD-ICD fúziós fehérjék vagy variánsok, vagy olyan polinukleotidok, amik az ilyen ECD-ICD fúziós fehérjéket kódolják. A nukleinsav molekulák előnyösen DNS molekulák. A jelen találmány szerinti HER-2/neu ECD-ICD fúziós fehérjékben az ECD és ICD polipeptid komponensek vagy közvetlenül, vagy egy linkeren, azaz például egy aminosav linkeren vagy más típusú linkeren keresztül lehetnek fuzionáltatva. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a jelen találmány szerinti ECD-ICD fúziós fehérje a HER-2/neu ECD-t vagy annak egy részét tartalmazza, közvetlenül a HER-2/neu ICD-hez vagy annak egy részéhez fuzionáltatva.

Egy további megvalósítási mód szerint az ECD-ICD fúziós fehérjében az ECD mérete úgy változtatható meg, hogy egymás után eltávolítunk körülbelül 1-100 aminosav csoportot az ECD C-terminálisáról, előnyösen körülbelül 100 aminosav csoportot. Hasonlóképpen, az ICD mérete az ECD-ICD fúziós fehérjében úgy változtatható meg, hogy egymás után eltávolítunk körülbelül 1 - 100 aminosav csoportot az ICD N-terminálisáról és C-terminálisáról. A kapott variáns formák antigenitásuk és/vagy immuno-



genitásuk alapján szelektálhatók, a szakirodalomban és az alábbiakban ismertetett megfelelő szűrővizsgálati módszereket használva, hogy a jelen találmány szerint használjuk őket.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány szerinti vegyületek tartalmazzák a HER-2/neu ECD-PD fúziós fehérjéket, vagy azok variánsait, vagy az ilyen ECD-PD fúziós fehérjéket kódoló nukleinsav molekulákat. Az egyik megvalósítási mód szerint a HER-2/neu ECD-t a HER-2/neu Δ PD-hez fuzionáltatjuk. A nukleinsav molekulák előnyösen DNS molekulák. A jelen találmány szerinti HER-2/neu ECD-PD fúziós fehérjékben az ECD és PD vagy Δ PD polipeptid komponensek vagy közvetlenül, vagy egy linkeren, azaz például egy peptid linkeren lehetnek fuzionáltatva. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a jelen találmány szerinti ECD-PD fúziós fehérjék a HER-2/neu ECD-t tartalmazzák, közvetlenül a HER-2/neu PD-hez vagy a HER-2/neu Δ PD-hez fuzionáltatva. Itt, és a leírás során a jelen találmány szerinti fúziós fehérjék egy előnyben részesített megvalósítási módja a HER-2/neu PD fúziós fehérje.

Egy másik megvalósítási mód szerint az ECD mérete az ECD-PD fúziós fehérjében megváltoztatható, ha egymás után körülbelül 1 - 100 aminosav csoportot eltávolítunk az ECD C-terminálisáról, előnyösen körülbelül 100 aminosavat. Hasonlóképpen, a PD mérete az ECD-PD fúziós fehérje mérete megváltoztatható, ha egymás után aminosavakat távolítunk el a PD N-terminálisáról. Ismét, az előnyben részesített megvalósítási mód a PD. Más variáns formák is kiválaszthatók antigenitásuk és/vagy immunogenitásuk alapján, a szakirodalomban és az alábbiakban ismertetett szűrővizsgálati módszerekkel, a jelen találmány szerinti felhasználás céljából.



Az 1. táblázatban azt láthatjuk, hogy ha 100 aminosavat eltávolítunk az ECD C-terminálisáról, akkor annak nincs hatása az ECD-PD fúziós fehérje expressziós szintjére és stabilitására.

1. Táblázat

ECD_{csontkított}PD összefoglalás

Klón	A deléció területe (bázispár / aminosav)	A bázis- pár sor- száma	Az aminosav sor- száma	Relatív exp- resszió
A5	1655-1882/552-628	228	76	***
B4	1660-1866/554-622	207	69	**
B9	1595-1891/532-631	297	99	***
C2	1681-1902/561-634	222	74	*
C7	1612-1902/538-634	291	97	*****
F10	1634-1951/545-651	318	106	****
ECD-PD WT	-	-	-	*

Az ECD-ICD fúziós fehérje és az ECD-PD fúziós fehérje variánsai közé tartoznak a természetes ECD-ICD fúziós fehérje és az ECD-PD fúziós fehérje különböző strukturális formái. Az ionizálható N-terminális és C-terminális csoportok jelenléte miatt például a HER-2/neu ECD-ICD vagy ECD-PD fúziós fehérje lehet sav vagy bázis formájában, vagy lehet semleges formájú. Az egyes aminosav csoportok is módosíthatók oxidációval vagy redukcióval.

A jelen találmány oltalmi körébe tartozó más variánsok közé tartoznak az ECD-ICD fúziós fehérjék vagy az ECD-PD fúziós fehérjék, amikben a HER-2/neu ECD-ICD fehérje vagy a



természetes HER-2/neu ECD-PD fehérje primer aminosav struktúrája módosítható más peptidekkel vagy polipeptidekkel, vagy kémiai egységekkel, azaz például glikozil csoportokkal, lipidekkel, foszfáttal, acetil-csoportokkal és hasonlókkal való kovalens vagy aggregatív konjugátumok készítésével. A kovalens származékokat például úgy készíthetjük el, hogy különböző funkciós csoportokat kapcsolunk az aminosav oldalláncokhoz, vagy az N-terminálishoz vagy a C-terminálishoz.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá a HER-2/neu ECD-ICD fúziós fehérjék és a HER-2/neu ECD-PD fúziós fehérjék, glikozilezve vagy glikozilezés nélkül. Az élesztőben vagy emlős expressziós rendszerekben expresszált ECD-ICD fúziós fehérjék és az ECD-PD fúziós fehérjék lehetnek hasonlóak, vagy molekulasúlyuk vagy glikozilezési mintázatuk lehet enyhén eltérő a természetes molekulákétól, az expressziós rendszertől függően. A polipeptideket kódoló DNS expressziója baktériumokban, azaz például *Escherichia coli*-ban tipikus esetben nem-glikozilezett molekulákat eredményez. Az eukarióta fehérjék N-glikozilezési pontjait az Asn-A₁-Z aminosav triplétt jellemzi, amiben A₁ jelentése Pro kivételével bármelyik aminosav, Z jelentése Ser vagy Thr. A HER-2/neu ECD-ICD vagy ECD-PD fúziós fehérjék variáns formái, amik inaktivált N-glikozilezési pontokat tartalmaznak, a szakterületen jártas szakember számára ismert technikákkal állíthatók elő, azaz például oligonukleotid szintézissel és ligálással, vagy helyspecifikus mutagenézis technikákkal, és ezek mind a jelen találmány oltalmi körébe tartoznak. Egy másik változat szerint az N-kapcsolt glikozilezési helyek hozzáadhatók a HER-2/neu ECD-ICD vagy ECD-PD fúziós fehérjéhez.



A jelen találmány szerinti ECD-ICD fúziós fehérjék közé, amik lehetnek variánsok is, tartozhatnak a humán és nem-humán polipeptidok lehetséges kombinációi. A nem-humán polipeptidok bármilyen emlősből, azaz például patkányból, egérből, tengerimalacból, lóból, szarvasmarhából, sertésből, birkából, kutyából, stb. származó polipeptidok lehetnek. Az egyik megvalósítási mód szerint az ECD-ICD fúziós fehérjék közé a következők tartoznak:

- i) humán ECD-humán ICD fúziós fehérjék, például azok, amik a humán ECD (9. ábra, 3. számú szekvencia) és a humán ICD (ami a 7. ábrán látható, az 1. számú szekvenciavázlaton bemutatott, a 676-os (Lys) – 1255-ös (Val) aminosavakra kiterjedő szekvencia) összekapcsolásával jönnek létre, kémiai és/vagy aminosav kapcsoló csoporttal vagy anélkül, és ezek variánsai;
- ii) patkány ECD-patkány ICD fúziós fehérjék, például azok, amik a patkány ECD (14. ábra, 8. számú szekvencia) és a patkány ICD (ami a 8. ábrán látható, a 2. számú szekvenciavázlaton bemutatott, a 677-es (Lys) – 1256-os (Val) aminosavakra kiterjedő szekvencia) összekapcsolásával jönnek létre, kémiai és/vagy aminosav kapcsoló csoporttal vagy anélkül, és ezek variánsai;
- iii) humán ECD-patkány ICD fúziós fehérjék, például azok, amik a humán ECD (9. ábra, 3. számú szekvencia) és a patkány ICD (ami a 8. ábrán látható, a 2. számú szekvenciavázlaton bemutatott, a 677-es (Lys) – 1256-os (Val) aminosavakra kiterjedő szekvencia) összekapcsolásával jönnek létre, kémiai és/vagy aminosav kapcsoló csoporttal vagy anélkül, és ezek variánsai;



- iv) patkány ECD-humán ICD fúziós fehérjék, például azok, amik a patkány ECD (14. ábra, 8. számú szekvencia) és a humán ICD (ami a 7. ábrán látható, az 1. számú szekvenciavázlaton bemutatott, a 676-os (Lys) – 1255-ös (Val) aminosavakra kiterjedő szekvencia) összekapcsolásával jönnek létre, kémiai és/vagy aminosav kapcsoló csoporttal vagy anélkül, és ezek variánsai.

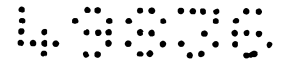
A jelen találmány szerinti ECD-ICD fúziós fehérjék bármilyen variánsai a jelen találmány megvalósítási módjai közé tartoznak. Az egyik megvalósítási mód szerint az ilyen variánsok lényegében azonosak vagy lényegében hasonlóak a természetes HER-2/neu ECD-ICD fehérjéhez, és megtartják azt a képességüket, hogy stimulálják az immunválaszt. Az ECD fehérjét kódoló humán DNS szekvenciákat például a 15. ábrán mutatjuk be (9. számú szekvencia), amik az 1-1959-es nukleotidokra terjednek ki. Az ICD fehérjét kódoló humán DNS szekvenciákat például a 15. ábrán (9. számú szekvencia) mutatjuk be, amik a 2026-3765-ös nukleotidokra terjednek ki. Bármilyen szekvencia-módosításnak a HER-2/neu ECD-ICD fehérje azon képességére gyakorolt hatása, hogy immunválaszt generáljon, könnyen meghatározható például úgy, hogy elemezzük a mutált HER-2/neu ECD-ICD fehérjének azt a tulajdonságát, hogy T-sejt választ indukál, például az itt ismertetett módszereket használva, vagy a mutált HER-2/neu ECD-ICD fehérjének azt a képességét elemezve, hogy ellenanyagot termel.

A jelen találmány szerinti ECD-PD fúziós fehérjék közé, amik lehetnek variánsok is, tartozhatnak a humán és nem-humán polipeptidek lehetséges kombinációi. A nem-humán polipeptidek bármilyen emlősből, azaz például patkányból, egérből, tenge-
rimalacból, lóából, szarvasmarhából, sertésből, birkából, kutyából,



stb. származó polipeptidek lehetnek. Az egyik megvalósítási mód szerint az ECD-PD fúziós fehérjék közé a következők tartoznak:

- i) humán ECD-humán PD fúziós fehérjék, például azok, amiket a 12. ábrán mutatunk be (6. számú szekvencia), vagy azok variánsai, beleértve azokat a fúziós fehérjéket, amik a humán ECD (9. ábra, 3. számú szekvencia) és a humán PD (ami a 10. ábrán látható, a 4. számú szekvenciavázlat) összekapcsolásával jönnek létre, kémiai és/vagy aminosav kapcsoló csoporttal vagy anélkül, és ezek variánsai;
- ii) patkány ECD-patkány PD fúziós fehérjék, például azok, amik a patkány ECD (14. ábra, 8. számú szekvencia) és a patkány PD (ami a 8. ábrán látható, a 2. számú szekvenciavázlaton bemutatott, a 991-es (Gln) – 1256-os (Val) aminosavakra kiterjedő szekvencia) összekapcsolásával jönnek létre, kémiai és/vagy aminosav kapcsoló csoporttal vagy anélkül, és ezek variánsai;
- iii) humán ECD-patkány PD fúziós fehérjék, például azok, amik a humán ECD (9. ábra, 3. számú szekvencia) és a patkány PD (ami a 8. ábrán látható, a 2. számú szekvenciavázlaton bemutatott, a 991-es (Gln) – 1256-os (Val) aminosavakra kiterjedő szekvencia) összekapcsolásával jönnek létre, kémiai és/vagy aminosav kapcsoló csoporttal vagy anélkül, és ezek variánsai;
- iv) patkány ECD-humán PD fúziós fehérjék, például azok, amik a patkány ECD (14. ábra, 8. számú szekvencia) és a humán PD (ami a 7. ábrán látható, a



10. számú szekvencia) összekapcsolásával jönnek létre, kémiai és/vagy aminosav kapcsoló csoporttal vagy anélkül, és ezek variánsai.

A jelen találmány szerinti ECD-PD fúziós fehérjék bármilyen variánsa is a jelen találmány megvalósítási módjai közé tartozik. Az egyik megvalósítási mód szerint az ilyen variánsok lényegében azonosak, vagy lényegében hasonlóak a természetes HER-2/neu ECD-PD fehérjéhez, és megtartják azt a képességét, hogy immunválaszt stimulálnak. Az ECD fehérjét kódoló humán DNS szekvenciákat például a 15. ábrán (9. számú szekvencia) mutatjuk be, az 1-1959-es nukleotidokra kiterjedően. A PD fehérjét kódoló humán DNS szekvenciákat például a 15. ábrán (9. számú szekvencia) mutatjuk be, a 2968-3765-ös nukleotidokra kiterjedően. Bármilyen szekvencia-módosításnak a HER-2/neu ECD-PD fehérje azon tulajdonságára gyakorolt hatását, hogy immunválaszt kelt, könnyen meghatározhatjuk, ha például elemezzük a mutált HER-2/neu ECD-PD fehérjének azt a képességét, hogy T-sejt választ vált ki, például az alábbiakban ismertetett eljárások alkalmazásával, vagy ha elemezzük a mutált HER-2/neu ECD-PD fehérjének azt a tulajdonságát, hogy ellenanyag termelődik ellene.

Egy másik megvalósítási mód szerint az ECD-PD fúziós fehérjék a jelen találmány szerinti ECD- Δ PD fúziós fehérjék, amik lehetnek variánsok, beleértve a humán és nem-humán polipeptidek bármilyen lehetséges kombinációját. Nem-humán polipeptid lehet például patkány, egér, tengerimalac, ló, szarvasmarha, sertés, birka, kutya, stb. eredetű polipeptid. Az egyik megvalósítási mód szerint az ECD- Δ PD fúziós fehérjék közé az alábbiak tartoznak:



- i) humán ECD-humán Δ PD fúziós fehérjék, a 13. ábrán bemutatott módon (7. számú szekvencia), valamint ezek variánsai, beleértve azokat a fúziós fehérjéket, amik a 9. ábra szerinti humán ECD (3. számú szekvencia) és a 11. ábra szerinti Δ PD (5. számú szekvencia) összekapcsolásából keletkeznek, kémiai és/vagy aminosav kapcsoló csoporttal vagy anélkül, valamint ezek variánsai;
- ii) patkány ECD-humán Δ PD fúziós fehérjék, amik a 14. ábrán látható patkány ECD (8. számú szekvencia) és a patkány Δ PD összekapcsolásával keletkeznek, ami a 8. ábrán látható aminosav szekvencia (2. számú szekvencia) 991-es (Gln) -1049-es (Arg) aminosavait tartalmazza, kémiai és/vagy aminosav kapcsoló csoporttal vagy anélkül, valamint ezek variánsai;
- iii) humán ECD-patkány Δ PD fúziós fehérjék, amik a 9. ábrán bemutatott humán ECD (3. számú szekvencia) és a patkány Δ PD összekapcsolásából keletkeznek, ami a 8. ábrán látható aminosav szekvencia (2. számú szekvencia) 991-es (Gln) -1049-es (Arg) aminosavait tartalmazza, kémiai és/vagy aminosav kapcsoló csoporttal vagy anélkül, valamint ezek variánsai;
- iv) patkány ECD-humán Δ PD fúziós fehérjék, amik a 14. ábrán bemutatott patkány ECD (8. számú szekvencia) és a 11. ábrán látható humán Δ PD (5. számú szekvencia) összekapcsolásából keletkeznek, kémiai



és/vagy aminosav kapcsoló csoporttal vagy anélkül, valamint ezek variánsai.

A jelen találmány szerinti ECD- Δ PD fúziós fehérjék bármilyen variánsai a jelen találmány megvalósítási módjait jelentik. Az egyik megvalósítási mód szerint az ilyen variánsok lényegében azonosak, vagy lényegében hasonlóak a természetes HER-2/neu ECD- Δ PD fehérjéhez, és megtartják azt a tulajdonságát, hogy immunválaszt stimulál. Az ECD fehérjét kódoló humán DNS szekvenciákat például a 15. ábrán mutatjuk be (9. számú szekvencia), amik az 1-1959-es nukleotidokra terjednek ki. Δ PD fehérjét kódoló humán DNS szekvenciákat például a 15. ábrán mutatunk be (9. számú szekvencia), amik a 2968-3144-es nukleotidokra terjednek ki. . Bármilyen szekvencia-módosításnak a HER-2/neu ECD- Δ PD fehérje azon tulajdonságára gyakorolt hatását, hogy immunválaszt kelt, könnyen meghatározhatjuk, ha például elemezzük a mutált HER-2/neu ECD- Δ PD fehérjének azt a képességét, hogy T-sejt választ vált ki, például az alábbiakban ismertetett eljárások alkalmazásával, vagy ha elemezzük a mutált HER-2/neu ECD- Δ PD fehérjének azt a tulajdonságát, hogy ellenanyag termelődik ellene.

Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a jelen találmány szerinti HER-2/neu ECD-PD fúziós fehérjék ECD-PD fúziós fehérjék.

Néhány specifikus megvalósítási mód szerint a jelen találmány szerinti fúziós fehérjék tartalmazhatnak egy fúziós partnert, azaz például egy immunológiai fúziós partnert, vagy egy expresszió-fokozót. Egy fúziós partner például segíthet T segítő epitopok (egy immunológiai fúziós partner) biztosításában, amik előnyösen T segítő epitopok, amiket az emberek felismernek,



vagy segíthetik a fúziós fehérjének a rekombináns fúziós fehérjénél magasabb szinten való expresszióját (expressziós fokozó). Más fúziós partnerek is kiválaszthatók, például azzal a céllal, hogy növeljük a fúziós fehérje oldhatóságát, vagy hogy lehetővé tegyük, hogy a fúziós fehérje a kívánt intracelluláris kompartmentekbe irányuljon. További fúziós partner lehet még egy affinitás jelölés, ami megkönnyíti a fúziós fehérje tisztítását.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá azok a fúziós fehérjék, amik tartalmaznak egy itt ismertett fúziós polipeptidet, egy azzal rokonságban nem levő immunológiai fehérjével. Az immunogén fehérje előnyösen képes visszahívási válasz kiváltására. Ilyen fehérje lehet például a tetanusz, tuberkulózis és hepatítisz fehérje [Stoute és mtsai: *The New England Journal of Medicine* 336, 86-91 (1997)].

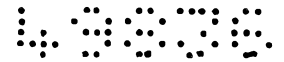
Más megvalósítási módok szerint az immunológiai fúziós partner a protein D-ből származik, a *Hemophilus influenzae* B Gram-negatív baktérium sejtfelszíni fehérjéjéből (WO 91/18926). Egy protein D származék előnyösen a fehérjének körülbelül az első harmadát tartalmazza (azaz az első 100-110 N-terminális aminosavat), és egy protein D származék lipidálva is lehet. Néhány előnyben részesített megvalósítási mód szerint egy Lipoprotein D fúziós partner első 109 csoportja van az N-terminálison, hogy a fúziós fehérjét további exogén T-sejt epitopokkal együtt biztosítsa, és hogy fokozza az expressziós szintet *Escherichia coli*-ban. A lipidfarok biztosítja a fúziós fehérjének az antigént prezentáló sejteknek való optimális prezentációját. Más fúziós partnerek közé tartozik az influenza vírus nem-strukturális, NS1 fehérjeje (hemagglutinin). Tipikus esetben a 81 N-ter-



minális aminosavat használjuk, bár a T-segítő epitopokat tartalmazó különböző fragmensek is használhatók.

Egy másik megvalósítási mód szerint a immunológiai fúziós partner a LYTA néven ismert fehérje, vagy annak egy része (előnyösen egy C-terminális rész). A LYTA *Streptococcus pneumoniae*-ből származik, ami egy LYTA amidáz néven ismert N-acetil-L-alanin amidázt termel [ezt a LytA gén kódolja; Gene 43, 265-292 (1986)]. A LYTA egy autolizin, ami specifikusan lebont bizonyos kötéseket a peptidoglikán gerincben. A LYTA fehérje C-terminális doménje felelős a kolinhoz, vagy néhány kolin analóghoz, azaz például a DEAE-hez való affinitásért. Ezt a tulajdonságot a fúziós fehérjék expresszáálásában használt *Escherichia coli*-LYTA expressziós plazmidok fejlesztésében használták ki. Az N-terminálisán a C-LYTA fragmenst tartalmazó hibrid fehérjék tisztítását a szakirodalomban már leírták [Biotechnology 10, 795-798 (1992)]. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a LYTA egy ismétlődő részét beépíthetjük egy fúziós fehérjébe. Egy ismétlődő rész található a C-terminális régióban, a 178-as csoportnál kezdődően. Egy különösen előnyben részesített ismétlődő rész a 188-305-ös csoportokra terjed ki.

Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a jelen találmány szerinti fúziós fehérjék tartalmaznak még egy fúziós partnert is. Az előnyben részesített fúziós partnerek közé tartozik, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, az Ra12 vagy az LeIF. Pontosabban, a jelen találmány tárgyát az Ra12 vagy az LeIF szekvencia fúziós partnerként való felhasználáshoz szükséges anyagok és módszerek képezik, amik megkönnyítik a rekombináns fúziós polipeptid magas szinten való expresszióját, vagy megtörik a toleranciát.



Az Ra12 a *Mycobacterium tuberculosis* MTB32A kódoló szekvencia egy 14 kDa-os C-terminális fragmense, ami maga is magas szinten expresszálódik, és a tisztítási eljárás során oldható marad. Az LeIF egy *Leishmania* antigén, ami homológ az eukarióta eIF riboszómális fehérjével, és képes stimulálni a Th1 és/vagy a CTL immunválaszt (5,876,966, 5876,735 és 5,879,687 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás). A jelen találmányban az Ra12 és az LeIF polipeptideknek ezeket a tulajdonságait használjuk ki, és a jelen találmány tárgyát képezik továbbá a HER-2/neu fúziós polipeptidek mellett az Ra12 vagy LeIF polipeptid rekombináns nukleinsav molekulái, expressziós vektorai, gazdasejtjei, valamint a fúziós polipeptidek stabil és magas szintű expressziójának módszerei. A rekombináns nukleinsavak, amik egy Ra12 vagy LeIF polipeptidet tartalmazó fúziós polipeptidet és egy számunkra érdekes fúziós fehérjét kódolnak, könnyen előállíthatók hagyományos génsebészeti módszerekkel. A rekombináns nukleinsavakat előnyösen úgy állítjuk elő, hogy a fúziós partner polinukleotid szekvencia a kiválasztott fúziós fehérje szekvenciához viszonyítva 5' pozícióban található. Az is megfelelő lehet, ha egy fúziós partner polinukleotid szekvenciát 3' pozícióban helyezünk el a számunkra érdekes fúziós fehérje polinukleotid szekvenciájához viszonyítva, vagy a fúziós fehérje polinukleotid szekvenciáját a fúziós partner polinukleotid szekvencia egyik pontjába építjük be. Emellett bármilyen megfelelő polinukleotid, ami egy fúziós partnert vagy annak egy részét vagy más variánsát kódolja az itt ismertetett módon, használható a jelen találmány szerinti rekombináns fúziós nukleinsavak konstruálására.



A jelen találmány szerinti fúziós partnert kódoló nukleinsavak bármilyen, a szakterületen ismert megfelelő módszerrel előállíthatók. A példaként megadott módszerek közé tartozik a megfelelő szekvenciák klónozása és restrikciós emésztése, vagy a közvetlen kémiai szintézis például a foszfotriészter módszerrel [Narang és mtsai: *Methods in Enzymology* 68, 90-99 (1979)], Brown és munkatársai foszfodiészter módszerével [Brown és mtsai: *Methods in Enzymology* 68, 109-151 (1979)], Beaucage és munkatársai dietilfoszforamidit módszerével [Beaucage és mtsai: *Tetra. Lett.* 22, 1859-1862 (1981)], valamint a 4,458,066 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás szilárd hordozós módszere.

Egy fúziós partner polipeptidet és egy kiválasztott fúziós fehérjét tartalmazó fúziós polipeptidet kódoló rekombináns nukleinsavat bármilyen, a szakterületen ismert módszerrel előállíthatjuk. Amint azt az előzőkben ismertettük, a rekombináns nukleinsavakat úgy konstruáljuk meg, hogy a fúziós partner polinukleotid szekvencia a számunkra érdekes fúziós fehérjét kódoló polinukleotid szekvenciához viszonyítva 5' irányban helyezkedik el. A fúziós partner és fúziós fehérje polinukleotid szekvenciákat is módosíthatjuk, hogy megkönnyítsük fúziójukat és azt követő expressziójukat.

A rekombináns nukleinsavak emellett tartalmazhatnak más nukleotid szekvenciákat is, azaz olyan szekvenciákat, amik affinitás jelöléseket tartalmaznak, hogy megkönnyítsük a fehérjetisztítási protokollt.

D. A jelen találmány szerinti fúziós fehérjék variánsai



A CD4⁺ T-sejtek általában felismernek olyan antigéneket, amik a tumorsejtekhez viszonyítva külsők, idegenek. Ezzel ellentétben, normális körülmények között a peptideknek az I-es osztályú MHC-hoz való kötődése csak olyan fehérjék esetében fordul elő, amik a citoszólban vannak, és a célpont maga szintetizálja meg, a külső környezetben levő fehérjék ki vannak zárva. Egy kivétel ez alól az exogén peptidek kötődése egy pontos I-es osztályú motívumhoz, amik a sejten kívül magas koncentrációban vannak jelen. Tehát a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejteknek nagyon eltérő funkciójuk van, és hajlanak arra, hogy különböző antigéneket felismerjenek, azt tükrözve, hogy az antigének normális körülmények között hol találhatóak.

Az aminosav helyettesítések készítésének egy másik módja a jelen találmány szerinti variánsok előállítására céljából, ha azonosítjuk és helyettesítjük a T-sejt motívumokban levő aminosavakat, amiknek megvan a potenciáljuk, hogy kötődjenek a II-es osztályú MHC molekulákhoz (a CD4⁺ T-sejt válaszhoz) vagy az I-es osztályú MHC molekulákhoz (a CD8⁺ T-sejt válaszhoz). Egy HER-2/neu ECD-ICD vagy ECD-PD fúziós fehérje peptid szegmenseit egy olyan motívummal, aminek megvan az elméleti potenciálja arra, hogy kötődjön a II-es osztályú MHC molekulákhoz, számítógépes elemzéssel lehet azonosítani. Például használható egy fehérjeszekvencia elemzési csomag, a *T sites*, ami számos különböző számítógépes algoritmust tartalmaz, és úgy tervezték, hogy a T-sejt felismerés potenciális pontjait megkülönböztessék [Feller és mtsai: Nature 349, 720-721 (1991)]. Két keresési algoritmust használunk: 1) a Margalit és munkatársai által leírt AMPHI algoritmus [Feller és mtsai: Nature 349, 720-721 (1991); Margalit és mtsai: J. of Immunol. 138,



2213-2229 (1987)] az alfa-helikális periodicitás és amfipatikusság alapján azonosítja az epitop motívumokat; 2) a Rothbard és Taylor algoritmus a töltés- és polaritás mintázatnak megfelelően azonosítja az epitop motívumokat [Rothbard és mtsai: EMBO 7, 93-100 (1988)]. A mindkét motívumot tartalmazó szegmensek a legmegfelelőbbek a II-es osztályú MHC molekulákhoz való kapcsolódásra. A CD8⁺ T-sejtek felismerik az I-es osztályú MHC molekulákhoz kötődő peptideket. Parker és munkatársai meghatározták, hogy a bizonyos MHC molekulákhoz kötődő peptidek közös, megfigyelhető szekvencia motívumokat tartalmaznak. A HLA-A2.1 barázdájába való kötődésért felelős peptid motívumot egy tenyésztett sejtvonal HLA-A2.1 molekuláktól megfosztott peptidek Edman degradációjával definiáljuk [2. táblázat; Falk és mtsai: Nature 351, 290-296 (1991)]. A módszer úgy azonosítja a tipikus vagy átlagos HLA-A2.1 kötő peptidet, hogy 9 aminosavból áll, és domináns rögzítő csoportok vannak a 2-es (L) és 9-es (V) csoportban. Az általánosan előforduló erős kötő csoportokat azonosítottunk a 2-es (M), 4-es (E,K), 6-os (V) és 8-as (K) pozícióban. Az azonosított motívum számos kötő peptid átlagát reprezentálja.

2. Táblázat

	Aminosav pozíció									Pont hozzárendelés
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Domináns kötődés rögzítő csoport		L							V	+3
Erős kötődés csoport		M		E K		V		K		+2



Gyenge kötődés csoport	I		A	G	I	I	A	E	L	+1
	L		Y	P	K	L	Y	S		
	F		F	D	Y	T	H			
	K		P	T	N					
	M		M		G					
	Y		S		V					
					H					

A származtatott peptid motívum a jelenlegi definíció szerint nem különösen szigorú. Néhány HLA-A2.1 kötő peptid nem tartalmazza mindkét rögzítő csoportot, és a domináns rögzítő csoportot körülvevő aminosav csoportok fő szerepet játszanak a kötődés engedélyezésében vagy nem engedélyezésében. Nem mindegyik, a jelenleg ismertett motívumot tartalmazó peptid kötődik, és néhány, a motívumot nem tartalmazó peptid kötődik. Azonban a jelenlegi motívum eléggé érvényes ahhoz, hogy lehetővé tegye néhány, kötődésre képes peptid azonosítását. Megjegyezzük, hogy mindegyik MHC molekula és a megfelelő motívumok 6 aminosavat helyeznek el a 2-es és 9-es pozícióban levő domináns rögzítő aminosavak közé.

A peptid motívumoknak a HER-2/neu ECD-ICD vagy ECD-PD fúziós fehérjében való azonosítását követően konzervatív vagy nem-konzervatív aminosav helyettesítéseket tehetünk. Az utóbbi típusú helyettesítéseknek az a céljuk, hogy javított ECD-ICD vagy ECD-PD fúziós fehérjét állítsunk elő, vagy egy olyan polipeptid, ami hatékonyabb és/vagy szélesebb keresztreaktivitást mutat. A hatékonyabb fehérje vagy peptid egyik példája az, amelyik nagyobb affinitással kötődik ugyanahhoz az MHC molekulához mint a természetes fehérje vagy polipeptid. A szélesebb keresztre-



aktivitású polipeptid egyik példája az, amelyik szélesebb keresztreaktivitású immunválaszokat indukál (azaz az MHC molekulák nagyobb részéhez kötődik) mint a természetes polipeptid. Hasonlóképpen, egy vagy több, a peptid motívumok között levő és térkitöltő funkciójú aminosav (azaz ami nem lép kölcsönhatásba egy MHC molekulával vagy T-sejt receptorral) helyettesíthető konzervatívan és nem konzervatívan. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy az egy vagy több aminosav helyettesítést tartalmazó polipeptidek számos különböző módszerrel vizsgálhatók a jótékony és káros immunológiai kölcsönhatásaik szempontjából, beleértve az itt ismertetetteket is, amik a T-sejt felismerésre írtunk le.

A jelen találmány oltalmi körébe tartozó variánsok is lehetnek, vagy egy másik változat szerint tartalmazhatnak más módosításokat, beleértve az aminosavak delécióját és addícióját is, amiknek minimális hatásuk van a polipeptid kívánt immunológiai tulajdonságaira, amint azt az előzőekben ismertettük. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy a a HER-2/neu ECD-ICD vagy ECD-PD fúziós fehérje csonkított formái vagy nem-természetes meghosszabbított formái is használhatók, azzal a feltétellel, hogy a kívánt immunológiai tulajdonságok legalább durván ekvivalensek a teljes hosszúságú, természetes HER-2/neu ECD-ICD vagy ECD-PD fúziós fehérjével. A cisztein csoportok kivághatók vagy helyettesíthetők más aminosav csoportokkal, hogy megakadályozzuk az inkorrekt intramolekuláris diszulfid-hidak képződését a renaturálás során. A mutagenézis más megközelítési módja lehet a szomszédos kétbázisos aminosav csoportok módosítása, azzal a céllal, hogy



fokozzuk az expressziót azokban az élesztő rendszerekben, amikben a KEX2 proteáz aktivitás jelen van.

A jelen találmány szerinti fúziós fehérjék készítése

A. A fúziós fehérjét kódoló polinukleotidok

A jelen találmány tárgyát izolált vagy tisztított polinukleotidok képezik, amik a HER-2/neu fúziós fehérjét kódolják. A jelen találmány szerint bármilyen nukleotid szekvencia, ami a fúziós fehérje aminosav szekvenciáját kódolja használható olyan rekombináns molekulák generálására, amik vezérlik a fúziós fehérje expresszióját.

Abból a célból, hogy a HER-2/neu fúziós polinukleotidok generálásához a teljes hosszúságú kódoló szekvenciákat vagy homológ variánsokat klónozzuk, a HER-2/neu nukleotid szekvenciák vagy komplementereik bármilyen részéből tervezett jelzett DNS próbákat használhatjuk egy genomiális vagy cDNS könyvtár átvizsgálására, hogy azonosítsuk a fúziós fehérje egyes komponensei kódoló szekvenciáját. A HER-2/neu nukleotid szekvenciák származhatnak bármilyen megfelelő emlősből, azaz például patkányból, egérből, lóból, szarvasmarhából, sertésből, birkából, kutyából, stb.

Az egyik megvalósítási mód szerint a HER-2/neu szekvencia származhat emberből, patkányból vagy egérből. Az egér HER-2/neu szekvenciáját a 19. ábrán mutatjuk be (11. számú szekvencia). Az egér HER-2/neu is amplifikálható egéragy RNS-ből, az alábbi primerek alkalmazásával: 5' primer: CCATGGAGCTGGCGGCCTGGTGCCGTTG (12. számú szekvencia) és 3' primer: GGCCTTCTGGTTCATACTGGACATCCAGGC (13. számú szekvencia). Az egér HER-2/neu aminosav szekvenciáját a 20. ábrán



mutatjuk be (14. számú szekvencia). Az egér HER-2/neu variáns aminosav szekvenciáját Nagata és munkatársai publikálták [Nagata és mtsai: *J. of Immunol.* 159, 1336-1343 (1997)].

Az ilyen klónok úgy izolálhatók, hogy egy megfelelő expressziós könyvtárat átvizsgálunk, hogy tartalmaz-e olyan klónokat, amik a teljes hosszúságú HER-2/neu fehérjét expresszálják. A könyvtár készítését és átvizsgálását általában a szakterületen jártas szakember számára ismert módszerekkel lehet elvégezni [Sambrook és mtsai: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 2. kiadás, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk]. Röviden, egy bakteriofág expressziós könyvtárat kiszélesztünk és szűrőlapokra viszünk át. A szűrőlapokat azután egy kimutató reagenssel inkubáljuk. Ennek a találmánynak a szövegösszefüggésében a „kimutató reagens” lehet bármilyen vegyület, ami képes kötődni a HER-2/neu fehérjéhez, ami azután a szakterületen jártas szakember számára ismert, számos különböző módszerrel kimutatható. Egy tipikus kimutató reagens tartalmaz egy „kötő ágens”, azaz Protein A-t, Protein G-t, IgG-t vagy lektint, egy riporter csoporthoz kapcsolva. Az előnyben részesített riporter csoportok lehetnek enzimek, szubsztrátok, kofaktorok, inhibítorok, festékek, radioaktív izotópok, lumineszcens csoportok, fluoreszcens csoportok és biotin. Még előnyösebb, ha a riporter csoport torma-peroxidáz, ami azután egy megfelelő szubsztráttal, azaz például tetrametilbenzidinnel, vagy 2,2'-azino-di-3-etilbenz-tiazolin szulfonsavval inkubálva lehet kimutatni. A HER-2/neu fehérjét kódoló genomiális vagy cDNS-t tartalmazó tarfoltokat izoláljuk, és a szakterületen jártas szakember számára ismert módszerekkel tisztítjuk. A megfelelő módszerek a



szakirodalomban megtalálhatók [Sambrook és mtsai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 2. kiadás, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)].

A kódoló szekvenciákat polimeráz láncreakcióval (PCR) is izolálhatjuk, két degenerált oligonukleotid primer pool-t használva, amiket az itt ismertetett kódoló szekvenciák alapján terveztünk. A kívánt nukleinsavakat is klónozzhatjuk, a szakterületen jól ismert amplifikálási technikákkal. A protokollok példái, amik a szakterületen jártas szakember számára elegendőek ahhoz, hogy az *in vitro* amplifikálási eljárásokat, beleértve a polimeráz láncreakciót, a ligáz láncreakciót (LCR), és más RNS polimeráz alapú technikákat használják, megtalálhatók a szakirodalomban [[Sambrook és mtsai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 2. kiadás, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Current Protocols in Molecular Biology, szerk.: Ausubel és mtsai, Greene Publishing és Wiley-Interscience: New York (1987); 4,683,202 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, szerk.: Innis és munkatársai (1990); Arnheim & Levinson: C&EN, 36-47 (1990. október 1.); The Journal of NIH Research 3, 81-94 (1991); Kwoh és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 86, 1173 (1989); Guatelli és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 87, 1874 (1990); Lomell és mtsai: J. Clin. Chem. 35, 1826 (1989); Landegren és mtsai: Science 241, 1077-1080 (1988); Van Brunt: Biotechnology 8, 291-294 (1990); Wu és mtsai: Gene 4, 560 (1989); Barringer és mtsai: Gene 89, 117 (1990)]. Az *in vitro* amplifikált nukleinsavak javított klónozási módszereit Wallace és munkatársai publikálták (5,426,039



számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás). A jelen találmány szerinti nukleinsavak amplifikálásában használt megfelelő primerek az itt biztosított szekvenciák alapján tervezhetők meg.

A jelen találmány szerinti polinukleotid, ami egy fúziós fehérjét, annak fragmensét vagy funkcionális ekvivalensét kódolja, arra használható, hogy rekombináns nukleinsav molekulát állítsunk elő vele, ami vezérli a fúziós fehérje, annak fragmense vagy funkcionális ekvivalense expresszióját a megfelelő gazdasejtekben. Az ilyen polinukleotidok által kódolt fúziós polipeptid termékek a kódoló szekvencia molekuláris manipulálásával megváltoztathatók.

A genetikai kód öröklött degenerációja miatt más DNS szekvenciák, amik lényegében ugyanazt, vagy egy funkcionálisan ekvivalens aminosav szekvenciát kódolják, használhatók a jelen találmány gyakorlatában a fúziós polipeptidek expresszálására. Ilyen DNS szekvencia lehet például az, amelyik képes hibridizálódni az itt ismertetett kódoló szekvenciákhoz vagy azok komplementereihez, az alábbiakban ismertetett alacsony, közepes vagy magas szigorúsági körülmények között.

A jelen találmányban használható megváltoztatott nukleotid szekvenciák tartalmazhatnak deléciókat, addíciókat vagy különböző nukleotid csoportok helyettesítését, olyan szekvenciát eredményezve, ami ugyanazt a génterméket, vagy egy azzal funkcionálisan ekvivalens génterméket kódolja. A géntermék maga tartalmazhat deléciókat, addíciókat vagy aminosav csoportok helyettesítését, amik néma változást eredményeznek, ezzel egy funkcionálisan ekvivalens antigén epitopot eredményezve. Az ilyen konzervatív aminosav helyettesítések megtehetőek a polaritás, töltés,



oldhatóság, hidrofobicitás, hidrofilitás és/vagy a szóban forgó csoportok amfipatikus természetében levő hasonlóság alapján. Például a negatív töltésű aminosavak közé tartozik az aszparaginsav és a glutaminsav; a pozitív töltésű aminosavak közé tartozik a lizin, a hisztidin és az arginin; a töltetlen poláros fejjel és hasonló hidrofobicitási értékkel rendelkező aminosavak közé az alábbiak tartoznak: glicin, aszparagin, glutamin, szerin, treonin és tirozin; és az apoláros fej csoportokat tartalmazó aminosavak közé tartozik az alanin, a valin, az izoleucin, a leucin, a fenilalanin, a prolin, a metionin és a triptofán.

A jelen találmány szerinti nukleotid szekvenciákat megváltoztathatjuk, hogy megváltoztassuk a fúziós fehérjét kódoló szekvenciát, számos különböző célból, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, azokat a változásokat, amik módosítják a géntermék processzálását és expresszióját. Például mutációk vihetők be, a szakterületen jól ismert technikák alkalmazásával, azaz például restriktációs hasítási helyek beszúrására vagy kivágására, a glikozilezési, foszforilezési mintázat megváltoztatására, transzlációs iniciációs és/vagy terminációs szekvenciák létrehozására és/vagy elrontására, és a kódoló régió variációinak létrehozására, hogy megkönnyítsük a további *in vitro* módosítást, stb. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy egy adott nukleinsav konstrukcióban számos különböző módon hajtható végre változtatás. Ilyen jól ismert módszer például a helyspecifikus mutagenézis, a polimeráz láncreakciós amplifikálás degenerált oligonukleotidok felhasználásával, a nukleinsavat tartalmazó sejtek érintkeztetése kémiai mutagén ágensekkel vagy sugárzással, egy kívánt oligonukleotid kémiai szintézise (azaz például ligálással és/vagy klónozással összekötve, nagyobb



nukleinsavak előállítása céljából) valamint más jól ismert technikák [Giliman és mtsai: *Gene* 8, 81-97 (1979); Hutchinson és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* 253, 6551 (1978); Roberts és mtsai: *Nature* 328, 731-734 (1987)]. A manipulációk előnyösen nem rontják el a fúziós polipeptidek immunogenitását.

A jelen találmány egyik megvalósítási módja szerint egy fúziós fehérje kódoló szekvenciáját részben vagy egészben megszintetizálhatjuk a szakterületen jól ismert kémiai módszerekkel is [Carruthers és mtsai: *Nucleic Acids Research Symp. Ser.* 7, 215-233 (1980); Crea és mtsai: *Nucleic Acids Research* 9(10), 2331 (1980); Matteucci és mtsai: *Tetrahedron Letters* 21, 719 (1980); Chow és mtsai: *Nucleic Acids Research* 9(12), 2807-2817 (1981)].

B. Polipeptid szintézis

Egy másik változat szerint a fúziós fehérjéket közvetlenül előállíthatjuk kémiai módszerekkel megszintetizálva egy aminosav szekvenciát vagy annak egy részét. A peptidek például megszintetizálhatók szilárd fázisú technikákkal, azaz például a Merrifield féle szilárd fázisú szintézis módszerrel, aminek során az aminosavakat egymás után adjuk aminosavak egy növekvő láncához [Merrifield: *Journal of the American Chemical Society* 85, 2149-2146 (1963)]. A polipeptidek automatizált szintézisére képes berendezés különböző szállítóktól szerezhető be, például a Perkin Elmer Biosystems, Inc.-től (Foster City, CA), általában a gyártó utasításai szerint működtetve. A megszintetizált peptideket azután lehasíthatjuk a gyantáról, megtisztíthatjuk például nagynyomású folyadékkromatográfiával [Creighton: *Protein Structures and Molecular Principles* 50-60 (1983)]. A szintetikus fúziós polipeptidek összetételét aminosav elemzéssel vagy szekve-



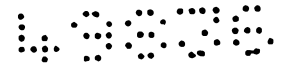
nálással igazolhatjuk [lásd Edman degradációs módszer; Creighton: Protein Structures and Molecular Principles 34-49 (1983)].

Emellett nem-klasszikus aminosavak vagy az aminosavak kémiai analógjai is bevihetők helyettesítésként vagy addícióként a szekvenciába. A nem-klasszikus aminosavak közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, az általános aminosavak D-izomerjei, az α -amino-izovajsav, a 4-aminovajsav, az Abu, a 2-aminovajsav, a γ -Abu, az ϵ -Ahx, a 6-aminohexánsav, az Aib, a 2-aminoizovajsav, a 3-aminopropionsav, az ornitin, a norleucin, a norvalin, a hidroxiprolin, a szarkozin, a citrullin, a ciszteinsav, a t-butilglicin, a t-butilalanin, a fenilglicin, a ciklohexilalanin, a β -alanin, a fluoro-aminosavak, a tetszés szerint tervezett aminosavak, azaz például a β -metil aminosavak, a $C\alpha$ -metil aminosavak, az $N\alpha$ -metil aminosavak és általában az aminosav analógok. Emellett az aminosav lehet D (jobbra forgató) vagy L (balra forgató).

C. Kapcsoló csoportok

Egy másik megvalósítási mód szerint a fúziós fehérje polipeptidje, azaz az ECD és ICD, vagy az ECD és PD, egy kapcsoló csoporton keresztül kapcsolódik össze. A kapcsoló csoport lehet egy kémiai keresztkötést létrehozó ágens, beleértve például a szukcinimidil-(N-maleimidometil)-ciklohexán-1-karboxilátot (SMCC). A kapcsoló csoport lehet még további aminosav szekvencia, beleértve például egy poliglicin csoportot is.

Egy specifikus megvalósítási mód szerint a fúziós fehérjében levő egyes polipeptidek kódoló szekvenciái közvetlenül kap-



csolódnak az N-terminálisukon vagy a C-terminálisukon egy peptidkötésen keresztül, bármilyen sorrendben.

Egy másik megvalósítási mód szerint egy aminosav linker szekvencia használható arra, hogy az első és második polipeptid komponenst elég nagy távolságra eltávolítsuk egymástól ahhoz, hogy biztosítsuk, hogy az egyes polipeptidek felveszik a megfelelő szekunder és terciér struktúrájukat. Egy ilyen aminosav linker szekvenciát a szakterületen jól ismert hagyományos technikákkal vihetünk be a fúziós fehérjébe. A megfelelő peptid linker szekvenciákat az alábbi tényezők alapján lehet kiválasztani: 1) képesek egy flexibilis, megnyújtott konformáció felvételére; 2) nem képesek olyan szekunder struktúrát felvenni, ami kölcsönhatásba léphet az első és a második polipeptiden levő funkcionális epitópokkal; és 3) nincsenek benne hidrofób vagy töltött csoportok, amik reagálhatnak a polipeptid funkcionális epitópjaival. Az előnyben részesített peptid linker szekvenciák Gly, Asn, és Ser csoportokat tartalmaznak. Más közel semleges aminosavak, azaz például a Thr és az Ala is használhatók a linker szekvenciában. A linkerként jól használható aminosav szekvenciákat több publikációban is közölték már [Maratea és mtsai: *Gene* **40**, 39-46 (1985); Murphy és mtsai: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **83**, 8258-8262 (1986); 4,935,233 és 4,751,180 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás]. A linker szekvencia általában 1-50 aminosavat tartalmaz. Nincs szükség linker szekvenciára, ha az első és második polipeptidnek nem-esszenciális N-terminális aminosav régiói vannak, amik arra használhatók, hogy elválasszák a funkcionális doméneket és megakadályozzák a térbeli gátlásokat.



Más kémiai linkerek lehetnek például a szénhidrát linkerek, a lipid linkerek, a zsírsav linkerek, a poliéter linkerek, azaz például a PEG, stb. [Hermanson: Bioconjugate Techniques (1996)].

D. További polipeptidek

Amint azt az előzőkben ismertettük, a fúziós fehérje egy vagy több további polipeptidhez kapcsolódhat. A fúziós polipeptid például a fúziós fehérje két polipeptidje közül az egyiknek egy vagy több kópiájához kapcsolódhat. Egy másik változat szerint a fúziós fehérje egy további heterológ polipeptidhez, azaz például az Ra12-höz vagy az LeIF-hez kapcsolódhat, az előzőkben ismertett módon. A fúziós polipeptid fuzionálhat egy affinitás jelöléshez, az expresszió utáni tisztítás megkönnyítésére. Például a jelölés által kódolt több hisztidin csoport lehetővé teszi a fémkelát affinitáskromatográfiai módszerek alkalmazását a fúziós polipeptidek tisztítására. Az affinitás jelölési molekulák más példája lehet a Strep-tag, a PinPoint, a maltózkötő fehérje, a glutation S-transzferáz, stb. [Glick & Pasternak: Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA, 2. kiadás (1999)].

Az egyik megvalósítási mód szerint a fúziós polipeptid adott esetben egy lipid egységhez, azaz például mikolsavhoz, lipoaribdomanin-hoz („LAM-ok”) vagy trehalóz származékokhoz kapcsolódik.

Amint azt az előzőkben ismertettük, az egyik megvalósítási mód szerint egy ilyen fúziós fehérjét a fúziós fehérjét kódoló nukleinsav rekombináns expressziójával állítjuk elő. Egy ilyen fúziós terméket úgy állíthatunk elő, hogy a kívánt aminosav szekven-



ciákat kódoló megfelelő nukleinsav szekvenciákat a szakterületen jól ismert módszerekkel egymáshoz ligáljuk, helyes leolvasási keretben, majd a terméket a szakterületen jól ismert módszerrel expresszáljuk. Egy másik változat szerint egy ilyen terméket fehérje-szintézis technikákkal lehet előállítani, azaz például peptid-szintetizátorral. A más molekulákat, azaz például egy citokint vagy egy adjuvánst kódoló szekvenciákat is hozzáadhatjuk a fúziós polinukleotidhoz.

E. Szekvencia-módosítások

A jelen találmány szerinti fúziós fehérjék variánsait, amik megtartják a képességüket, hogy immunválaszt stimuláljanak, általában úgy azonosíthatjuk, hogy az előzőkben ismertetett egy vagy több szempontból módosítjuk a szekvenciáját, majd vizsgáljuk a kapott fúziós fehérjét, hogy képes-e immunválaszt, azaz például egy T-sejt választ vagy egy ellenanyag választ stimulálni. Egy ilyen vizsgálatot például általában úgy hajthatunk végre, hogy T-sejteket hozunk érintkezésbe a módosított fúziós fehérjével, és vizsgáljuk a választ. A fúziós fehérje egyes polipeptid komponenseinek természetben előforduló variánsait például úgy izoláljuk, hogy egy megfelelő cDNS vagy genomiális könyvtárat egy olyan DNS szekvenciával vizsgálunk át, ami az egyes polipeptideket, vagy azoknak egy variánsát kódolja.

Az előzőkben említett szekvencia-módosításokat bejuttathatjuk standard rekombináns technikákkal, vagy a módosított fúziós fehérje automatizált szintézisével. A mutációkat például úgy juttathatjuk be egy bizonyos lókuszbba, hogy egy mutáns szekvenciát tartalmazó oligonukleotidokat szintetizálunk, amiket restriktív hasítási helyek határolnak, amik lehetővé teszik a fe-



hérjek ligálását a természetes szekvencia fragmenseihez. A ligálást követően a kapott rekonstruált szekvencia a kívánt aminosav inszerciót, helyettesítést vagy delécióit tartalmazó analógot kódolja.

Egy másik változat szerint oligonukleotiddal vezérelt helyspecifikus mutagenézis eljárásokat használhatunk olyan gén biztosítására, amiben a kiválasztott kodonok a megkívánt helyettesítésnek, deléciónak vagy inszerciónak megfelelően vannak megválasztva. A változások létrehozásának módszereit a szakirodalomban ismertették [Walder és mtsai: *Gene* 42, 133 (1986); Bauer és mtsai: *Gene* 37, 73 (1985); Craik: *BioTechniques*, January, 12-19 (1985); Smith és mtsai: *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Plenum Press (1981); 4,518,584 és 4,737,462 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás].

Az ilyen HER-2/neu expressziójához konstruált nukleotid szekvenciákban a mutációknak természetesen meg kell őrizniük a kódoló szekvenciák leolvasási keretét, és előnyösen nem szabad olyan komplementer régiókat létrehozni, amik hibridizálódnak, szekunder mRNS struktúrákat, azaz például hurkokat vagy hajtű struktúrákat létrehozva, amik előnytelenül érintik az mRNS translációját. Bár a mutációs pont meghatározható, ezért nem szükséges, hogy a mutáció természetét *per se* meghatározzuk. Például ahhoz, hogy kiválasszuk a mutánsok optimális jellemzőit egy adott pontban, random mutagenézist hajtunk végre a megcélzott kodonnál, és a HER-2/neu fúziós fehérje mutánsokat átvizsgáljuk a kívánt aktivitás szempontjából. A HER-2/neu fúziós fehérjét kódoló nukleotid szekvenciában nem az összes mutáció expresszálódik a végtermékben. Például nuk-



leotid helyettesítéseket tehetünk az expresszió fokozására, elsődlegesen azzal a céllal, hogy elkerüljük a szekunder struktúra hurkokat az átírt mRNS-ben (75,444A számú Európai szabadalmi leírás), vagy hogy olyan kodonokat biztosítsunk, amik könnyebben átírhatók a kiválasztott gazdaszervezetben, azaz például a jól ismert, az *Escherichia coli* által preferált kodonokat az *Escherichia coli* expresszióban.

F. Expressziós vektorok

A jelen találmány szerinti HER-2/neu fúziós fehérjét, és azok variánsait előnyösen rekombináns DNS módszerekkel állítjuk elő. Ilyen módszer például egy HER-2/neu fúziós fehérjét kódoló DNS szekvencia beszúrása egy rekombináns expressziós vektorba, és a DNS szekvencia expresszálása egy rekombináns mikrobiális, emlős, gomba vagy rovar sejt expressziós rendszerben, olyan körülmények között, amik elősegítik az expressziót, és előnyösen a fúziós fehérje szekréciónak. A jelen találmány szerinti HER-2/neu fúziós fehérjét cDNS fragmensekből és rövid oligonukleotid linkerekből állíthatjuk össze, vagy oligonukleotid sorozatokból, ezzel egy olyan szintetikus gént biztosítva, ami alkalmas arra, hogy egy rekombináns expressziós vektorba beszúrjuk, és egy rekombináns transzkripciós egységben expresszáljuk.

A rekombináns expressziós vektorok tartalmazzak egy DNS szekvenciát, ami egy HER-2/neu fúziós fehérjét tartalmaz, működés szempontjából egy emlős, gomba, mikroorganizmus, vírus vagy rovar génekből származó megfelelő transzkripciós vagy translációs szabályozó elemhez kapcsolva. Ilyen szabályozó elem lehet például egy transzkripciós promoter, egy opcionális operátor szekvencia a transzkripció szabályozásához, egy megfe-



elő mRNS riboszómális kötőhelyeket kódoló szekvencia, valamint a transzkripció és a transláció leállítását kódoló szekvenciák. Emellett beépíthetünk egy replikációs origót és egy szelekciós markert, ami megkönnyíti a transzformánsok felismerését.

A DNS régiók működés szempontjából akkor vannak egymáshoz kapcsolva, ha funkcionálisan egymással rokonságban állnak. Például egy szignálpeptidet (szekréciós vezérszekvenciát) kódoló DNS-t működés szempontjából akkor kapcsolunk egy polipeptidet kódoló DNS-hez, ha prekurzorként expresszálódik, ami szerepet játszik a polipeptid szekréciójában; egy promoter működés szempontjából kapcsolódik egy kódoló szekvenciához, ha szabályozza a szekvencia transzkripcióját; vagy egy riboszómális kötőhelyet működés szempontjából egy kódoló szekvenciához kapcsolunk, ha elhelyezkedése olyan, hogy lehetővé teszi a translációt. Általánosságban a „működés szempontjából kapcsolt” szakkifejezés jelentése az, hogy egybefüggő, és a szekréciós vezérszekvenciák esetében leolvasási keretben van. Az egy mikroorganizmusban expresszálendő HER-2/neu fúziós fehérjét kódoló DNS szekvenciák előnyösen nem tartalmaznak intronokat, amik a DNS RNS-sé való átírását a szükségesnél korábban leállítanák.

A bakteriális használatra tervezett expressziós vektorok tartalmazhatnak egy szelekciós markert, valamint egy bakteriális replikációs origót, ami kereskedelmi forgalomban levő plazmidokból származhat, amik a jól ismert pBR322 (ATCC 37017) klónozó vektor genetikai elemeit tartalmazzák. Ilyen kereskedelmi forgalomban levő vektor például a pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Svédország), a pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI), a pET28b (Novagen) és a pPDM (egy módosított



pET28b, Corixa). Ezeket a pBR322 "gerinc" szekciókat kombináljuk egy megfelelő promoterral, és az expresszálandó strukturális szekvenciával. Az *Escherichia coli*-t tipikus esetben pBR322 származékokkal transzformáljuk (a pBR322 egy *Escherichia coli* fajból származó plazmid) [Bolivar és mtsai: *Gene* 2, 95 (1977)]. A pBR322 ampicillin és tetraciklin rezisztencia géneket tartalmaz, ezáltal egyszerű eszközt biztosít a transzformált sejtek azonosítására. A rekombináns mikrobiális expressziós vektorokban általánosan használt promoterek közé tartozik a béta-laktamáz (penicillináz) és a laktóz promoter rendszer [Chang és mtsai: *Nature* 275, 615 (1978); Goeddel és mtsai: *Nature* 281, 544 (1979)], a triptofán (*trp*) promoter rendszer [Goeddel és munkatársai: *Nucleic Acids Research* 8, 4057 (1980); 36,776 számú Európai szabadalmi leírás], és a *tac* promoter [Sambrook és mtsai: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 412. oldal, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982)]. Egy különösen hasznos bakteriális expressziós rendszer a lambda fág P_L promoterét, valamint a *ci857ts* hőérzékeny represszort használja. Az American Type Culture Collection-ből beszerezhető plazmidok közé, amik tartalmazzák a lambda P_L promotert, tartozik a pHUB2 plazmid (az *Escherichia coli* JMB9-es törzs a gazdatörzse, ATCC 37092), és a pPLc28 (az *Escherichia coli* RR1 törzs a gazdatörzse, ATCC53082).

Az élesztő vektorokban használható promoter szekvenciák közé tartoznak az alkohol-oxidáz, a 3-foszfoglicerát kináz [Hitzeman és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* 255, 2073 (1980)], valamint más glikolitikus enzimek promoterei [Hess és mtsai: *J. Adv. Enzyme Reg.* 7, 149 (1968); Holland és mtsai: *Biochem.* 17, 4900 (1978)], azaz például az enoláz, a gliceralde-

hid-3-foszfát dehidrogenáz, a hexokináz, a piruvát dekarboxiláz, a foszfofruktokináz, a glükóz-6-foszfát izomeráz, a 3-foszfoglicerát mutáz, a piruvát kináz, a triózfoszfát izomeráz, a foszfoglükóz izomeráz és a glükokináz. Az élesztőben való expresszióhoz alkalmas vektorokat és promotereket a 73,657 számú európai szabadalmi leírásban ismertetik.

Az előnyben részesített élesztő vektorokat a pBR322-ből származó DNS szekvenciák (amikkel az *Escherichia coli*-ban való szelekciót és replikációt lehet biztosítani, azaz az ampicillin-rezisztencia gén és a replikációs origó) valamint élesztő DNS szekvenciák használatával (ezek közé tartozhat például a glükózzal represszálható ADH2 promoter és az α -faktor szekréció vezérszekvencia) állíthatjuk össze. Az ADH2 promotert Russell és munkatársai valamint Beier és munkatársai publikálták [Russell és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* **258**, 2674 (1982); Beier és mtsai: *Nature* **300**, 724 (1982)]. Az élesztő α -faktor vezérszekvencia, ami a heterológ fehérjék szekrécióját vezérli, beilleszthető a promoter és az expresszálandó struktúrgén közé [Kurjan és mtsai: *Cell* **30**, 933 (1982); Bitter és mtsai: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **81**, 5330 (1984)]. A vezérszekvencia módosítható is, hogy tartalmazzon, a 3' végéhez közel, egy vagy több hasznos restriktív hasítási helyet, hogy megkönnyítse a vezérszekvenciának idegen génekhez való fúzió-náltatását.

Az expressziós vektorokban levő, a gerinces szervezetek sejtjeinek transzformálására használható transzkripció és transláció kontroll szekvenciákat virális forrásokból szerezhetjük be. Az általánosan használt promoterek és fokozó szekvenciák például poliómából, adenovírus 2-ből, majomvírusból



(SV40) és humán citomegalovírusból származhatnak. Az SV40 virális genomból származó DNS szekvenciák, azaz például az SV40 replikációs origó és a korai valamint a késői promoter, fokozó szekvencia, illesztési és poliadenilezési helyek arra használhatók, hogy egy heterológ DNS szekvencia expressziójához szükséges többi genetikai elemet biztosítsák. A korai és késői promoterek különösen hasznosak, mivel mindkettőt könnyen előállíthatjuk a vírusból egy olyan fragmens formájában, ami tartalmazza az SV40 virális replikációs origót is [Fiers és mtsai: *Nature* **273**, 113 (1978)]. Kisebb vagy nagyobb SV40 fragmensek is használhatók, azzal a feltétellel, hogy tartalmazzák a virális replikációs origóban levő, körülbelül 250 bázispár méretű szekvenciát, ami a HindIII hasítási helytől a BglII hasítási hely irányában található. Emellett, virális genomiális promoterek, kontroll és/vagy szignálszekvenciák is használhatók, azzal a feltétellel, hogy az ilyen kontroll szekvenciák kompatibilisek a kiválasztott gazdasejttel. A példaként megadott vektorok az Okayama és munkatársai által ismertetett módszerrel állíthatók elő [Okayama és mtsai: *Molecular & Cellular Biology* **3**, 280 (1983)].

Az emlős receptor cDNS-ek C127 rágcsáló emlő epiteliális sejtekben való stabil és magas szintű expressziójához használható rendszer lényegében Cosman és munkatársai leírása alapján konstruálható [Cosman és mtsai: *Mol. Immunol.* **23**, 935 (1986)]. A találmány szerinti fúziós fehérjék expressziójához megfelelő eukarióta vektor a pDC406 [McMahan és mtsai: *EMBO Journal* **10**, 2821 (1991)], ami tartalmaz SV40-ből, humán immundeficiencia vírusból (HIV) és Epstein Barr vírusból (EBV) származó szabályozó-szekvenciákat. Más vektor lehet még a pDC409 és



pDC410, amik a pDC406-ból származnak. A pDC10 a pDC406-ból úgy származik, hogy az Epstein Barr vírus replikációs origóját az SV40 nagy T antigénjét kódoló szekvenciákkal helyettesítjük. A pDC409 abban tér el a pDC406-tól, hogy a többszörös klónozó helyen kívüli BglII restriktációs hasítási helyet kivágjuk, ezzel a többszörös klónozó helyben levő BglII hasítási helyet egyedivé téve. Bármilyen más vektor megfelelő, ami lehetővé teszi a fehérjék expresszióját a CMV promoter, az SV40 korai promoter, az SV40 késői promoter, a metallothionein promoter, a rágcsáló emlőtumor vírus promoter, a Rous szarkóma vírus promoter, a polihedrin promoter, vagy más, az emlős sejtekben való expresszióban hatékonyan bizonyult promoter vezérlésével.

A transzkripció és transzláció kontroll szekvenciák mellett néhány expressziós rendszer tartalmaz markereket is, amik biztosítják a gén amplifikálását, azaz ilyen például a neomicin rezisztencia, timidin kináz, higromicin B foszfortranszferáz és dihidrofolát-reduktáz gén.

Egy hasznos sejtvonalt, ami lehetővé teszi az expressziós vektorok, azaz például a pDC406 és pDC409 episzómális replikációját, amik tartalmazzák az Epstein Barr vírus replikációs origóját, a CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478). A CV-1/EBNA sejtvonalt transzfekcióval keletkezett a CV-1 sejtvonaltból, az Epstein Barr vírus nukleáris antigén I-et (EBNA-I) kódoló génnel való transzfekcióval, és konstitutíve expresszálja az EBNA-1-et, a humán citomegalovírus közvetlen-korai fokozó/promoterével meg-hajtva.

A tenyésztett emlős sejtekben való expresszióhoz előnyben részesített vektorok közé tartozik a pFLAGCMV-1 (Kodak), a pcDNA3.1/hyg (Invitrogen) és a pEE14-GS (CellTech).



G. Gazdasejtek

A transzformált gazdasejtek azok a sejtek, amiket a rekombináns DNS technikákkal előállított expressziós vektorokkal transzformáltunk vagy transzfektáltunk, és amik tartalmazzák a jelen találmány szerinti HER-2/neu fúziós fehérjéket kódoló szekvenciákat. A transzformált gazdasejtek expresszálhatják a kívánt HER-2/neu fúziós fehérjéket, de a HER-2/neu DNS klónozására vagy amplifikálására transzformált gazdasejteknek nem feltétlenül kell expresszálniuk a fúziós fehérjéket. Az expresszált HER-2/neu fúziós fehérjék előnyösen szekretálódnak a tenyésztő táptalajba vagy felülúszóba, a kiválasztott DNS-től függően. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy ha a HER-2/neu fúziós fehérjék szekretálódnak a tenyésztet felülúszójába, akkor oldódnak is a tenyésztet felülúszójában.

Az idegen nukleotid szekvenciák gazdasejtekbe való bejuttatására használt bármelyik jól ismert eljárás használható az expressziós vektor bejuttatására. Ezek közé tartozik a különböző reagensekkel, azaz például a Superfect-tel (QIAGEN), a liposzómákkal, a kalcium-foszfáttal végzett transzfekció, a polibrén, a protoplaszt fúzió, az elektroporáció, a mikroinjekciózás, a plazmid vektorok, virális vektorok, a biolisztikus részecske-gyorsítás (a génpuska), vagy bármilyen más jól ismert módszer a klónozott genomiális DNS, cDNS, szintetikus DNS vagy más idegen genetikai anyag gazdasejtbe való bejuttatására [Sambrook és mtsai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 2. kiadás, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)].

A rekombináns fehérjék expressziójához használható megfelelő gazdasejtek közé tartoznak a prokarióták, az élesztő vagy



magasabbrendű eukarióta sejtek, megfelelő promoterek vezérlete alatt. A prokarióták lehetnek Gram-negatív vagy Gram-pozitív szervezetek, azaz például *Escherichia coli* vagy *Bacillus*. A magasabbrendű eukarióta sejtek közé tartoznak a rovar- vagy emlős eredetű, kialakított sejtvonalak, amiket az alábbiakban ismertetünk. Sejtmentes transzlációs rendszerek is használhatók HER-2/neu fúziós fehérjék előállítására, DNS konstrukciókból származó RNS-eket használva. A bakteriális, gomba, élesztő és emlős gazdaszervezetekben használható megfelelő klónozó és expressziós vektorokat a szakirodalomban már ismertették. [Pouvels és mtsai: Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York (1985)].

A prokarióta expressziós gazdaszervezetek olyan HER-2/neu fúziós fehérjék expressziójára használhatók, amiknek nincs szükségük kiterjedt proteolitikus és diszulfid processzálásra. A prokarióta expressziós vektorok általában tartalmazznak egy vagy több fenotípusos szelekciós markert, azaz például egy antibiotikum rezisztenciát biztosító fehérjét kódoló gént, vagy egy autotróf igényt szolgáló gént, valamint a gazdaszervezet által felismert replikációs origót, hogy biztosítsuk a gazdaszervezetben az amplifikációt. A transzformációra alkalmas prokarióta gazdaszervezetek közé tartoznak az *Escherichia coli* (azaz például a BL21 (DE3) CodonPlus *Escherichia coli*), a *Bacillus subtilis*, a *Salmonella typhimurium*, és a *Pseudomonas*, *Streptomyces* és *Staphylococcus* nembe tartozó különböző fajok, bár más gazdaszervezetek is használhatók.

A rekombináns HER-2/neu fúziós fehérjéket expresszáltathatjuk élesztő gazdaszervezetekben is, azaz például *Pichia pastoris*-ban. Más nembe tartozó élesztők is használhatók, azaz



például a *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, vagy a *Kluyveromyces*. A *Pichia*-ban való expressziót úgy érhetjük el, hogy az expresszálandó gént egy bakteriális ingázó vektorba (például a pPICZ sorozatba, Invitrogen Co.) ligáljuk, majd az élesztőt ezzel a vektorral transzformáljuk, és az élesztő genom alkohol oxidáz (AOX) lókuszába kromoszómálisan integráljuk. A rekombináns élesztő szelekcióját például Zeocin-nal (Invitrogen Co.) hajtjuk végre, majd a fehérje expresszióját metanolnak a növesztő táptalajhoz való adásával indukáljuk [Higgin és mtsai: „*Pichia* Protocols”, *Methods in Molecular Biology* 103, Humana Press (1998)]. A *Pichia* fehérje expresszáására alkalmas törzsei közé tartozik például az SMD1168 *Pichia* törzs. Más módszereken, azaz például az ESP rendszeren (Stratagene) alapuló expressziós rendszerek is használhatók.

Az élesztő transzformálására alkalmas transzformációs protokollok a szakterületen jártas szakember számára ismertek. Ilyen technikát írtak le például Hind és munkatársai [Hind és mtsai: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 75, 1929 (1978)], ebben Trp⁺ transzformánsokat szelektálnak egy szelektív táptalajban, ami 0,67% élesztő nitrogénalapot, 0,5% kazaminosavat, 2% glükózt, 10 mg/ml adenint és 20 mg/ml uracilt tartalmaz. Az ADH2 promotert tartalmazó vektorokkal transzformált gazdatörzsek elszaporíthatók, hogy egy 1% élesztő-kivonatot, 2% peptont és 1% glükózt tartalmazó gazdag táptalajon, ami 80 mg/ml adeninnel és 80 mg/ml uracillal van kiegészítve, expresszálják a fehérjét. Az ADH2 promoter derepressziója akkor történik meg, amikor a táptalajból elfogy a glükóz. A nyers élesztő felülúszókat szűréssel összegyűjtjük, majd a további tisztítás előtt 4 °C-on tartjuk.



Különböző emlős vagy rovar (azaz például *Spodoptera* vagy *Trichoplusia ni*) sejtenyészet rendszerek is használhatók a rekombináns polipeptid expresszáására. A heterológ polipeptidek rovarsejtekben való előállítására alkalmas bakulovírus rendszereket például Luckow és munkatársai foglalták össze [Luckow és mtsai: *BioTechnology* **6**, 47 (1988)]. A megfelelő emlős gazdasejtek közé tartoznak a majom vesesejtek COS-7 vonalai [Guzman: *Cell* **23**, 175 (1981)], valamint más sejtvonalak, amik képesek egy megfelelő vektor expresszáására, beleértve például a CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478) sejteket, az L sejteket, a C127, 3T3, aranyhőrcsög petefészek (CHO), a COS, az NS-1, a HeLa, a humán embrionális vese fibroblaszt (HEK 293) és BHK sejtvonalakat. Az emlős expressziós vektorok tartalmazhatnak nem átíródó elemeket is (azaz például replikációs origót, egy megfelelő promotert és/vagy fokozót, az expresszálandó génhez kapcsolva, valamint más 5' vagy 3' határoló nem-átíródó szekvenciákat), valamint 3' és 5' nem-transzlálódó szekvenciákat (azaz például a szükséges riboszómális kötőhelyeket, egy poliadenilezési helyet, illesztési donor és akceptor helyeket, valamint transzkripció terminációs szekvenciákat). Egy előnyben részesített emlős expressziós rendszer az aranyhőrcsög petefészek (CHO) sejtvonal.

H. A jelen találmány szerinti fúziós fehérjék tisztítása

A tisztított HER-2/neu fúziós fehérjét úgy állíthatjuk elő, hogy megfelelő gazda-vektor rendszereket állítunk elő, amik a jelen találmány szerinti DNS-ek rekombináns transzlációs termékeit expresszálják, amiket azután a tenyészközegekből vagy a sejtkivonatokból tisztítjuk. Például azokból a rendszerekből, amik



a rekombináns polipeptidet a tenyésztő közegbe szekretálják, a felülúszókat először koncentrálnak, egy kereskedelmi forgalomban levő fehérje-koncentráló szűrővel, azaz például egy Amicon vagy Millipore Pellicon ultraszűrő egységgel. A koncentráló lépést követően a koncentrátumot megfelelő tisztító hordozóra vihetjük fel. Például egy megfelelő affinitás mátrix tartalmazhat egy ellentétes struktúrájú fehérjét (azaz például egy olyan fehérjét, amihez egy HER-2/neu fúziós fehérje a struktúráján alapuló specifikus kölcsönhatással kötődik), vagy lektint, vagy ellenanyag molekulát, egy megfelelő hordozóhoz kapcsolva.

Egy másik változat szerint anioncserélő gyanta használható, például egy olyan mátrix vagy szubsztrát, aminek kilógó dietil-aminoetil (DEAE) csoportjai vannak. A mátrix lehet akrilamid, agaróz, dextrán, cellulóz, polisztirol, Sepharose vagy más, a fehérje-tisztításban általánosan használt típus. Egy másik változat szerint egy kationcserélő lépés is használható. A megfelelő kationcserélők közé tartoznak a különböző oldhatatlan mátrixok, amik szulfopropil- vagy karboximetil-csoportokat tartalmaznak, előnyösen szulfopropil-csoportokat. A gélszűrés kromatográfia is használható a HER-2/neu fúziós fehérjék tisztítására. A jelen találmány szerinti fúziós fehérjéket előnyösen anioncserélő kromatográfiával tisztítjuk, például monoQ oszlopokat vagy Q Sepharose High Performance kromatográfiát alkalmazva.

Az affinitáskromatográfia egy másik előnyben részesített módszer a HER-2/neu fúziós fehérjék tisztítására. Például a HER-2/neu fúziós fehérjék elleni monoklonális ellenanyagok jól használhatók az affinitáskromatográfiás tisztításban, a szakterületen jól ismert módszereket alkalmazva.



Végezetül, egy vagy több fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) lépést, amiben hidrofób RP-HPLC közeget (azaz például szilikagélt, amin kilógó metil- vagy más alifás csoportok vannak) alkalmazhatunk a HER-2/neu fúziós fehérje készítmények tovább tisztítására. Az előzőekben említett tisztítási lépések közül néhány, különböző kombinációkban, szintén használható homogén rekombináns fehérje vagy polipeptid előállítására.

A bakteriális tenyészetekben előállított rekombináns HER-2/neu fúziós fehérjék először a sejtüledékek extrahálásával, majd egy vagy több töményítéssel, kisózással, vizes ioncserélő vagy méretkizárásos kromatográfiás lépéssel állíthatók elő. Végző tisztítási lépésként nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC) használható. A rekombináns HER-2/neu fúziós fehérjék expresszáására használt mikrobiális sejtek bármelyik megfelelő módszerrel elroncsolhatók, beleértve a lefagyasztás-felolvasztás ciklusokat, az ultrahangos besugárzást, a mechanikai roncsolást, vagy a sejtlyázó ágensek alkalmazását.

Olyan élesztő fermentálása, ami a HER-2/neu fúziós fehérjéket szekretált fehérje formájában expresszája, nagymértékben egyszerűsíti a tisztítást. A nagytérfogatú fermentációból származó, szekretált rekombináns fehérjék az Urdal és munkatársai által publikált módszerekkel analóg módszerekkel tisztíthatók [Urdal és mtsai: *J. Chromatog.* **296**, 171 (1984)]. Ez a referencia két egymás utáni, fordított fázisú HPLC lépést ír le a rekombináns humán GM-CSF tisztítására preparatív HPLC oszlopon.

A rekombináns tenyészetekben szintetizált HER-2/neu fúziós fehérjék tartalmazhatnak nem-HER-2/neu sejt-komponenseket, beleértve fehérjéket, olyan mennyiségben, illetve olyan jel-



lemzőkkel, amik azoktól a tisztítási lépésektől függenek, amikkel a HER-2/neu fúziós fehérjéket a tenyészetből kinyerjük. Ezek a komponensek rendszerint élesztő, prokarióta vagy nem-humán eukarióta eredetűek. Az ilyen készítmények általában mentesek más fehérjéktől, amik normális körülmények között a HER-2/neu fehérjéhez kötődnek, amint az a természetben, az eredeti fajban megtalálható.

Az automatizált szintézis alternatív módszert biztosít a jelen találmány szerinti fehérjék és polipeptidek előállítására. Például bármilyen, kereskedelmi forgalomban levő szilárd fázisú technika használható, azaz például a Merrifield féle szilárd fázisú szintézis módszer, amiben az aminosavakat egymás után adjuk egy növekvő aminosav lánchoz [Merrifield: *Journal of the American Chemical Society* 85, 2149-2146 (1963)]. A polipeptidek automatizált szintéziséhez szükséges berendezések kereskedelmi forgalomban vannak, beszerezhetők különböző szállítóktól, például az Applied Biosystems, Inc.-től (Foster City, CA), és általában a gyártó utasításai szerint működtethetők.

Általánosságban, a polipeptideket (beleértve a fúziós fehérjéket) és az alábbiakban ismertetett polinukleotidokat izoláljuk. Egy „izolált” polipeptid vagy polinukleotid olyan anyag, amit eltávolítottunk az eredeti környezetéből. Például egy természetben előforduló fehérjét izolálunk, ha elválasztjuk az összes, a természetes rendszerben vele együtt található anyagtól, vagy azok egy részétől. Az ilyen polipeptidek előnyösen legalább 90%-ban tiszták, még előnyösebben legalább körülbelül 95%-os tisztaságúak, és legelőnyösebben legalább körülbelül 99%-os tisztaságúak. Egy polinukleotidot akkor tekintünk izoláltnak, ha



például egy olyan vektorba van klónozva, ami nem képezi a természetes környezet részét.

Kötő ágensek

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá azok az ágensek, azaz például ellenanyagok és azok antigén-kötő fragmensei, amik specifikusan kötődnek egy, a jelen találmány szerinti HER-2/neu fúziós fehérjéhez. Ahogy azt a továbbiakban használjuk, egy ellenanyagról, vagy annak ellenanyag-kötő fragmenséről akkor mondjuk, hogy „specifikusan kötődik” egy HER-2/neu fúziós fehérjéhez, ha kimutatható szinten reagál, azaz legalább a háttérjelnél kétszer magasabb szinten (például ELISA-ban) egy HER-2/neu fúziós fehérjével, és hasonló körülmények között nem reagál kimutatható szinten a HER-2/neu-val rokonságban nem levő fehérjékkel. A továbbiakban a „kötés” nem-kovalens asszociációt jelent két külön molekula között, azaz komplex képződését. A kötésre való képesség például úgy értékelhető ki, ha meghatározzuk a komplex képződésének kötési állandóját. A kötési állandó az az érték, amit akkor kapunk, ha a komplex koncentrációját a komponens koncentrációk termékével elosztjuk. Általánosságban, két vegyületről akkor mondjuk, hogy „kötődik”, a jelen találmány szövegösszefüggésében, ha a komplex képződés kötési állandója meghaladja a körülbelül 10^3 l/mol értéket. A kötési állandót a szakterületen jól ismert módszerekkel határozhatjuk meg.

A kötési állandók emellett arra is alkalmasak, hogy különbséget tegyünk olyan betegek között akiknek nincs, illetve van rájuk, azaz például emlő-, petefészek-, vastagbél-, tüdő- vagy prosztatárákjuk, az alábbiakban biztosított reprezentatív esszék-



kel. Másszóval, az ellenanyagok vagy más kötő ágensek, amik egy HER-2/neu fúziós fehérjéhez kötődnek, egy szignált generálnak, ami a rák jelenlétét jelzi a betegséget hordozó páciensek legalább 20%-ában, illetve nem generálnak szignált, ami a rákban nem szenvedő betegeknek legalább 90%-ában a betegség hiányát mutatja. Annak meghatározására, hogy egy kötő ágens megfelel-e ennek a követelménynek, a rákot hordozó illetve nem hordozó betegekből (amit standard klinikai tesztekkel határozzunk meg) vett biológiai mintákat (azaz vért, szérumot, plazmát, vizeletet és/vagy tumor biopsziákat) az itt ismertetett módon vizsgáljuk, hogy tartalmazznak-e a kötő ágenshez kötődő polipeptideket. Az nyilvánvaló, hogy a betegséget hordozó és nem hordozó minták statisztikailag szignifikáns számát le kell vizsgálni. Minden kötő ágensnek ki kell elégítenie a fenti kritériumokat; azonban a szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember számára nyilvánvaló, hogy a kötő ágensek kombinációban is használhatók, az érzékenység javítására.

Minden olyan ágens, ami megfelel a fenti követelményeknek, lehet kötő ágens. A kötő ágens lehet például egy riboszóma, a peptid komponensével vagy anélkül, egy RNS molekula vagy egy polipeptid. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint egy kötő ágens lehet ellenanyag, vagy annak egy antigént kötő fragmense. Az ellenanyagokat a szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember számára ismert számos különböző technika bármelyikével előállíthatjuk [Harlow és mtsai: „Antibodies: A Laboratory Manual, 2. kiadás, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)]. Általánosságban, az ellenanyagok sejtenyészési technikákkal állíthatók elő, beleértve a monoklonális ellenanyagok generálását az itt

ismertetett módszerrel, vagy az ellenanyag gének megfelelő bakteriális vagy emlős gazdasejtekbe való transzfektálását, azzal a céllal, hogy lehetővé tegyünk a rekombináns ellenanyagok előállítását. Az egyik technikában egy immunogént, ami tartalmaz például egy fúziós fehérjét, vagy azt a szekvenciát, ami megfelel egy számunkra érdekes fúziós fehérje egyes polipeptidjei közötti kapcsolódásnak (ezt nevezik „kapcsolódási régióknak”), először számos különböző emlősbe (azaz például egerekbe, patkányokba, nyulakba, birkákba vagy kecskébe) injekciózzuk. Ebben a lépésben a számunkra érdekes fúziós fehérje vagy a jelen találmány szerinti fúziós fehérje kapcsolódási régiója szolgál immunogénként, módosítás nélkül. Egy másik változat szerint, főleg a viszonylag rövid szekvenciák esetében, nagyon erős immunválasz kelthető, ha a szekvenciát egy hordozó fehérjéhez, azaz például szarvasmarha szérum-albuminhoz vagy fűrócsiga hemocianinhoz kapcsoljuk. Az immunogént az állati gazdaszervezetbe injekciózzuk, előnyösen egy előre meghatározott terv szerint, beleértve egy vagy több erősítő immunizációt, és az állatokat periodikusan véreztetjük. A fúziós polipeptidre specifikus poliklonális ellenanyagokat az antiszérumból tisztíthatjuk, például affinitáskromatográfiával, a fúziós polipeptidet egy megfelelő szilárd hordozóhoz kapcsolva.

A találmány szerint fúziós fehérje ellen készített poliklonális ellenanyagokat úgy szelektálhatjuk, hogy csak azokat a poliklonális ellenanyagokat kapjuk meg, amik specifikus immunreakciót adnak a számunkra érdekes fúziós fehérjével, de nem reagálnak a fúziós fehérjék egyedi polipeptid komponenseivel. Ezt a szelekciót úgy érhetjük el, hogy kihagyjuk azokat az ellena-



anyagokat, amik keresztreakciót adnak a számunkra érdekes fúziós fehérje egyedi polipeptid komponenseivel.

Egy másik változat szerint azok az ellenanyagok, amik felismerik a fúziós fehérje egyes, vagy összes egyedi polipeptid komponensét, jól használhatók lehetnek a jelen találmány szövegösszefüggésében.

A számunkra érdekes immunogén fúziós polipeptidre specifikus monoklonális ellenanyagokat például Kohler és Milstein módszerével [Kohler és Milstein: Eur. J. Immunol. 6, 511-519 (1976)], illetve annak egy javított változatával állíthatjuk elő. Röviden, ezek a módszerek magukban foglalják olyan örökéletű sejtvonalak készítését, amik képesek a kívánt specifitással rendelkező (azaz a számunkra érdekes fúziós polipeptiddel reagáló) polipeptideket előállítani. Az ilyen sejtvonalakot például az előzőekben ismertetett módon immunizált állatokból kapott lépsejtekből állíthatjuk elő. A lépsejteket azután örökéletűvé tesszük, például egy mielóma sejt-fúziós partnerrel végzett fúzióval, előnyösen egy, az immunizált állattal szingenikus partnerrel. Számos különböző fúziós technika alkalmazható. Például a lépsejteket és a mielóma sejteket néhány percre kombinálhatjuk egy nem-ionos detergenssel, majd kis sűrűségben egy olyan szelektív táptalajra széleszthetjük, ami támogatja a hibrid sejtek szaporodását, de nem támogatja a mielóma sejtek szaporodását. Egy előnyben részesített szelekciós technika HAT (hipoxantin, aminopterin, timidin) szelekciót alkalmaz. Megfelelő idő, általában 1-2 hét elteltével a hibridek telepei figyelhetők meg. A különálló telepeket kiválasztjuk, és tenyészetük felülúszóit vizsgáljuk, hogy mutatnak-e kötési aktivitást a fúziós polipeptiddel szemben. Azokat a



hibridómákat részesítjük előnyben, amik nagy reakcióképességgel és specifitással rendelkeznek.

A monoklonális ellenanyagokat a növekvő hibridóma telepekből izolálhatjuk. Emellett különböző technikák használhatók a kitermelés fokozására, azaz például a hibridóma sejtvonalnak egy megfelelő gerinces gazdaszervezet, azaz például egér hasüregébe való injekciózása. A monoklonális ellenanyagokat azután az ascitesz folyadékból vagy a vérből gyűjthetjük össze. A szennyeződések hagyományos technikákkal, azaz például kromatográfiával, gélszűrővel, kicsapással és extrakcióval távolíthatjuk el az ellenanyagokból. A jelen találmány szerinti fúziós polipeptidek használhatók a tisztítási eljárásban, például egy affinitáskromatográfiás lépésben.

Néhány megvalósítási mód szerint az ellenanyagok antigénkötő fragmenseinek használatát részesítjük előnyben. Ilyen fragmensek lehetnek a Fab fragmensek, amiket standard technikákkal készíthetünk el. Röviden, az immunglobulinokat affinitáskromatográfiával tisztíthatjuk nyúlszérumból, Protein A gyöngy oszlopokon [Harlow és mtsai: „Antibodies: A Laboratory Manual, 2. kiadás, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)], majd papainnal emésztjük, ezzel előállítva a Fab és Fc fragmenseket. A Fab és Fc fragmenseket affinitáskromatográfiával választjuk szét protein A gyöngy oszlopokon.

A jelen találmány szerinti monoklonális ellenanyagokat egy vagy több terápiás ágenshez kapcsolhatjuk. Az ebből a szempontból megfelelő ágensek közé tartoznak radioaktív izotópok, differenciálódást indukáló szerek, gyógyszer hatóanyagok, toxinok és ezek származékai. Az előnyben részesített radioaktív izotópok



közé tartozik a ^{90}Y , a ^{125}I , a ^{131}I , a ^{186}Re , a ^{211}At és a ^{212}Bi . Az előnyben részesített gyógyszer hatóanyagok közé tartozik a metotrexát, valamint a pirimidin és purin analógok. Az előnyben részesített gyógyszer hatóanyagok közé tartoznak a forbolészterek és a vajsav. Az előnyben részesített toxinok közé tartozik a ricin, az abrin, a *Diphtheria* toxin, a kolera toxin, a gelonin, a *Pseudomonas* toxin, a *Shigella* toxin és az alkörmös antivirális fehérje.

Egy terápiás ágenszt egy megfelelő ellenanyaghoz vagy közvetlenül, vagy közvetve (azaz például egy linker csoporton keresztül) kapcsolhatjuk hozzá (például kovalens kötéssel). Egy ágens és egy ellenanyag közötti közvetlen reakció akkor lehetséges, ha mindegyik tartalmaz olyan szubsztituenszt, amik képesek egymással reagálni. Például az egyikben egy nukleofil csoport, azaz például egy amino- vagy szulfhidril csoport, képes lehet reagálni a másikon egy karbonilt tartalmazó csoporttal, azaz például anhidriddel vagy savhalogeniddel, vagy egy alkilcsoporttal, ami egy jó leváló csoportot (azaz például halogenidet) tartalmaz.

Egy másik változat szerint kívánatos lehet, hogy egy terápiás ágenszt és egy ellenanyagot egy linker csoporton keresztül kapcsoljunk egymáshoz. A linker csoport térkitöltőként szolgálhat hogy az ellenanyagot távol tartsa egy ágensztől, azzal a céllal, hogy elkerüljük a kötési képesség megzavarását. Egy linker csoport arra is szolgálhat, hogy fokozza egy ágensen vagy ellenanyagon levő szubsztituens kémiai reakcióképességét, ezzel fokozva a kapcsolási hatékonyságot. A kémiai reakcióképesség fokozása emellett megkönnyítheti olyan ágensek, vagy az ágenseken levő funkciós csoportok használatát, amik egyébként nem lennének használhatók.



A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy számos különböző bifunkciós vagy polifunkciós reagens használható linker csoportként, amik lehetnek homo- és heterofunkciósok (azaz például azok, amiket a Pierce Chemical Co., Rockford, IL katalógusában találhatunk meg). A kapcsolást például aminocsoportokon, karboxil csoportokon, szulfhidril csoportokon vagy oxidált szénhidrát csoportokon keresztül hajthatjuk végre. Számos publikációban leírtak ilyen technikákat, beleértve például a 4,671,958 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírást.

Abban az esetben, ha egy terápiás ágens hatékonyabb, ha mentes a jelen találmány szerinti immunkonjugátumok ellennanyag részétől, kívánatos lehet olyan linker csoport használata, ami a sejtbe való bejutás során vagy után lehasad. Számos különböző lehasadó linker csoportot írtak le. Egy ágens ezekről a linker csoportokról való intracelluláris felszabadulásának mechanizmusa lehet egy diszulfid-híd redukciójával (azaz például a 4,489,710 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás), egy fényérzékeny kötés besugárzásával (azaz például 4,625,014 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás), derivatizált aminosav oldalláncok hidrolízisével (azaz például a 4,638,045 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás), szérum komplement által befolyásolt hidrolízissel (azaz például a 4,671,958 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás) és a savkatalizált hidrolízissel (azaz például a 4,569,789 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás) való lehasítás.

Kívánatos lehet, hogy egy ellenanyaghoz egynél több ágenset kapcsoljunk hozzá. Az egyik megvalósítási mód szerint az ágens



egynél több típusa kapcsolható egy ellenanyaghoz. Az éppen adott megvalósítási módtól függetlenül az egynél több ágenszt tartalmazó immunkonjugátumok számos különböző módon előállíthatók. Például egynél több ágens kapcsolható közvetlenül egy ellenanyag molekulához, vagy több kapcsolási pontot biztosító linkereket használhatunk. Egy másik változat szerint egy hordozó használható.

A hordozó számos különböző módon hordhatja az ágenseket, beleértve a közvetlen kovalens kötést vagy egy linker csoporton keresztül való kötést. A megfelelő hordozók közé tartoznak a fehérjék, azaz például az albuminok (azaz például a 4,507,234 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás), a peptidek és a poliszacharidok, azaz például az aminodextrán (azaz például a 4,699,784 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás). Egy hordozó hordozhat egy ágenszt nem-kovalens kötéssel vagy kapszulázással, azaz például egy liposzóma hordozóban (azaz például a 4,429,008 és 4,873,088 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás). A radioaktív izotópokra specifikus hordozók közé tartoznak a radioaktív halogéneket tartalmazó kis molekulák és kelátképző vegyületek. Például a 4,735,792 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban reprezentatív, radioaktív halogénatomokat tartalmazó kis molekulákat, valamint azok szintézisét ismertetik. Egy radioaktív izotópot tartalmazó kelát olyan kelátképző vegyületekből állítható elő, amik azokat a nitrogén- és kénatomokat tartalmazzák, mint a donor, a fém, a fénoxid, vagy a radioaktív izotóp megkötésére. A 4.763,562 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban pél-



dául ismertetik a reprezentatív kelátképző vegyületeket és szintézisüket.

Az ellenanyagok és immunkonjugátumok beadásának számos különböző módszere használható. A beadás tipikus esetben intravénás, intramuszkuláris, szubkután, vagy egy reszekált tumor ágyába történik. Az nyilvánvaló, hogy az ellenanyag/immunkonjugátum pontos dózisa függ az alkalmazott ellenanyagtól, az antigénnek a tumoron való sűrűségétől, valamint az ellenanyag kiürülési sebességétől.

A jelen találmány szerinti fúziós fehérjék ellen megfelelő, hozzáférhető ellenanyagok közé tartozik, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a 8029K nyúl poliklonális ellenanyag, az egér monoklonális c-neu-3 ellenanyag (Calbiochem) és az egér monoklonális Herceptin ellenanyag (5,677,171 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás). A monoklonális c-neu-3 ellenanyag felismeri a szekvenciális epitopot a PD doménben, amit az ECD- Δ PD konstrukcióból kivágtunk (1242-1255-ös aminosavak). A Herceptin ellenanyag az ECD doménben levő konformációs epitophoz kötődik.

T-sejtek

Az immunterápiás készítmények tartalmazhatnak még, vagy egy változatként tartalmaznak a jelen találmány szerinti fúziós fehérjére specifikus sejteket. Az ilyen sejtek általában *in vitro* vagy *ex vivo* állíthatók elő, standard eljárások alkalmazásával. A T-sejtek például izolálhatók csontvelőből, perifériális vérből, vagy egy beteg csontvelejének vagy perifériális vérének egy frakciójából, a kereskedelmi forgalomban beszerezhető sejt-szeparációs rendszerrel (5,240,856 és 5,215,926 számú Amerikai Egyesült



Államok-beli szabadalmi leírás, valamint a WO 89/06280, WO 91/16116 és WO 92/07243 számú szabadalmi leírás). Egy másik változat szerint a T-sejtek származhatnak rokon vagy nem-rokon emberekből, nem-humán emlősökből, sejtvonalakból vagy tenyészetekből.

A T-sejtek stimulálhatók egy HER-2/neu fúziós polipeptiddel, egy HER-2/neu fúziós fehérjét kódoló polinukleotiddal, és/vagy egy antigént prezentáló sejtrel (APC), ami ilyen fúziós fehérjét expresszál. Az ilyen stimulálást olyan körülmények között, és annyi ideig hajtjuk végre, hogy az lehetővé tegye a fúziós polipeptidre specifikus T-sejtek generálását. A HER-2/neu fúziós polipeptid vagy polinukleotid egy bejuttató hordozóban, azaz például mikrogömbben van jelen, hogy megkönnyítsék a specifikus T-sejtek generálását.

A T-sejteket akkor tekintik egy HER-2/neu fúziós polipeptidre specifikusnak, ha a T-sejtek elpusztítják a fúziós polipeptiddel borított sejteket, vagy a fúziós polipeptidet kódoló polinukleotidot expresszálnak. A T-sejt specifikitást a számos különböző technika közül bármelyikkel kiértékelhetjük. Például egy króm-felszabaduláson vagy szaporodáson alapuló esszében a negatív kontrollhoz viszonyítva a lízis és/vagy a szaporodás indexének több mint kétszeres növekedése a T-sejt specifikitást jelzi. Az ilyen vizsgálatokat például Chen és munkatársai módszerével hajthatjuk végre [Chen és mtsai: Cancer Res. 54, 1065-1070 (1994)]. Egy másik változat szerint a T-sejtek szaporodását számos különböző, ismert technikával mutathatjuk ki. A T-sejt szaporodását például úgy mutathatjuk ki, hogy megnövekedett DNS szintézis sebességét mérünk (azaz például T-sejtek triciált timidinnel való impulzus jelölésével, és a DNS-be beépült triciált



timidin mennyiségének mérésével). A 100 ng/ml-100 µg/ml, előnyösen 200 ng/ml-25 µg/ml HER-2/neu fúziós polipeptiddel 3-7 napig történő érintkezés a T-sejtek szaporodásának legalább kétszeres növekedését eredményezheti. Az előzőekben ismertetett, 2-3 órás kontaktusok a T-sejtek aktiválását eredményezhetik, amit standard citokin esszékkel mérhetünk, amiben a citokin (azaz például a TNF vagy az interferon- γ) felszabadulás szintjének kétszeres növekedése jelzi a T-sejt aktiválását [Coligan és mtsai: Current Protocols in Immunology 1, Wiley-Interscience, Greene (1998)]. Azok a T-sejtek, amik egy HER-2/neu fúziós polipeptidre, polinukleotidra vagy fúziós polipeptidet expresszáló APC-re adott válaszként aktiválódtak, lehetnek CD4⁺ és/vagy CD8⁺ sejtek. Az előnyben részesített megvalósítási módok szerint a T-sejtek egy betegből, vagy egy rokon vagy nem-rokon donorból származnak, és a betegnek stimulálás és expanzió után adjuk be.

Terápiás célokra a HER-2/neu fúziós polipeptidre, polinukleotidra vagy APC-re adott válaszként szaporodó CD4⁺ vagy CD8⁺ T-sejtek száma *in vitro* vagy *in vivo* növelhető. Az ilyen T-sejtek *in vitro* szaporodását számos különböző módon hajthatjuk végre. A T-sejteket például újra érintkezésbe hozhatjuk egy HER-2/neu fúziós polipeptiddel, T-sejt növekedési faktorok, azaz például interleukin-2 és/vagy HER-2/neu fúziós polipeptidet szintetizáló stimulátor sejtek hozzáadásával vagy anélkül. Egy másik változat szerint egy vagy több T-sejt, ami szaporodik HER-2/neu fúziós fehérje jelenlétében, számát klónozással megnövelhetjük. A sejtek klónozásának módszerei a szakterületen jól ismertek, ide tartozik a határhígítás. Az expanziót követően a sejteket a szaki-



rodalomban ismertetett módon visszaadhatjuk a betegnek [Chang és mtsai: Crit. Rev. Oncol. Hematol. 22, 213 (1996)].

A jelen találmány szerinti fúziós fehérjéket tartalmazó gyógyászati készítmények és vakcinák

Egy másik előnyben részesített megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgyát HER-2/neu fúziós fehérjéket vagy azok variánsait, valamint HER-2/neu ICD fehérjéket vagy azok variánsait tartalmazó készítmények képezik. A fúziós fehérjék előnyösen a jelen találmány szerinti ECD-ICD fúziós fehérjék, ECD-PD fúziós fehérjék vagy azok variánsai, amint azt az alábbiakban részletesen ismertetjük. Az ICD fehérje előnyösen a humán ICD fehérje, ami a 7. ábrán látható szekvencia (1. számú szekvencia) 676-os (Lys) - 1255-ös (Lys) régiójára terjed ki, vagy a patkány ICD fehérje ami a 8. ábrán látható szekvencia (2. számú szekvencia) 677-es (Lys) - 1256-os (Val) aminosav csoportjaira terjed ki. Egy másik változat szerint a HER-2/neu ICD fehérje az ICD fehérjének bármilyen variánsa vagy része lehet, ami immunogén, vagy a készítménynek fokozott immunogenitást biztosít. Az ICD fehérjének a része lehet például a HER-2/neu PD fehérje, az itt ismertetett módon, a HER-2/neu Δ PD fehérje, az itt ismertetett módon, a HER-2/neu KD fehérje, az itt ismertetett módon, vagy egy HER-2/neu ICD fehérje, amiből szekvenciálisan 1-100 aminosavat eltávolítottunk az ICD N-terminálisáról vagy C-terminálisáról. Emellett az aminosavak számos különböző módon helyettesíthetők, hogy a jelen találmány oltalmi körében más megvalósítási módokat biztosítsunk. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint konzervatív aminosav helyettesítések tehetők, amint azt az előzőekben ismertettük.

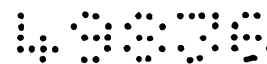


Néhány megvalósítási mód szerint itt ismertetett polipeptidek, polinukleotidok, T-sejtek és/vagy kötő ágensek tehetők be gyógyászati készítményekbe vagy immunogén készítményekbe (azaz például vakcinákba). A gyógyászati készítmények egy vagy több ilyen vegyületet és egy fiziológiásan elfogadható hordozót tartalmaznak. A vakcinák egy vagy több ilyen vegyületet és egy aspecifikus immunválasz fokozót tartalmazhatnak. Egy aspecifikus immunválasz fokozó bármilyen olyan anyag lehet, ami fokozza egy exogén antigén ellen az immunválaszt. Az aspecifikus immunválasz fokozók példái közé tartoznak az adjuvánsok, biológiailag lebomló mikrogömbök (azaz például a politejsav galaktid) és a liposzómák (amikbe egy vegyületet tettünk bele; lásd például a 4,235,877 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírást). A vakcinák készítését általánosságban ismertetik a szakirodalomban [Powell és Newman, szerk.: Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach), Plenum Press, New York (1995)]. A vakcinák úgy tervezhetők meg, hogy ellenanyag immunitást és/vagy celluláris immunitást generáljanak, például amilyenek a CTL vagy CD4⁺ T-sejtekből származnak.

A jelen találmány oltalmi körébe tartozó gyógyászati készítmények és vakcinák tartalmazhatnak más vegyületeket is, amik lehetnek biológiailag aktívak vagy inaktívak. Például egy vagy több immunogén rész vagy más tumor antigén lehet jelen, akár fúziós polipeptidbe építve, akár külön vegyület formájában, egy készítményben vagy egy vakcinában. A polipeptidek vagy konjugálva vannak más makromolekulákhoz (lásd például a 4,372,945 és 4,474,757 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírást), vagy nincsenek. A gyógyászati készítményeket és vakcinákat általában profilaktikus és terápiás célokra használják.



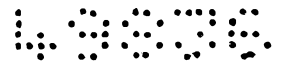
Egy gyógyászati készítmény vagy vakcina tartalmazhat egy vagy több HER-2/neu fúziós fehérjét, azaz például HER-2/neu ECD-ICD-t, és/vagy HER-2/neu ECD-PD-t kódoló polinukleotidot, az előzőekben ismertetett módon, oly módon, hogy a fúziós fehérjét *in situ* állítjuk elő. Egy ilyen polinukleotid tartalmazhat DNS-t, RNS-t, egy módosított nukleinsavat vagy egy DNS/RNS hibridet. Amint azt az előzőekben ismerttük, egy polinukleotid a szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember számára ismert bármelyik bejuttató rendszer jelen lehet, beleértve a nukleinsav expressziós rendszereket, a bakteriális és virális expressziós rendszereket. A szakterületen számos génbejuttató technika ismert, azaz például a Rolland és munkatársai által ismert technika [Rolland: Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15, 143-198 (1998), valamint a cikkben említett referenciák]. A nukleinsav expressziós rendszerek tartalmazzák a betegben való expresszióhoz szükséges DNS szekvenciákat (azaz például egy megfelelő promotert és terminátor szignálokat). A bakteriális bejuttató rendszerek magukban foglalják egy olyan baktérium (azaz például a *Bacillus Calmette-Guerin*) bejuttatását, ami a sejtfelületen expresszálja a fúziós fehérje immunogén részét, vagy egy ilyen epitopot szekretál. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a DNS-t egy virális expressziós rendszerrel (azaz például vakcína, himlővírus, retrovírus vagy adenovírus) juttathatjuk be, ami magában foglalhatja egy apatogén (defektív) replikáció kompetens vírus használatát. A megfelelő rendszereket a szakirodalomban ismertetik [Fischer-Hoch és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 86, 317-321 (1989); Flexner és mtsai: Ann. N.Y Acad. Sci 569, 86-103 (1989); Flexner és mtsai: Vaccine 8, 17-21 (1990); 4,603,112, 4,769,330,



4,771,127 és 5,017,487 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás, a WO 89/01973, GB 2,200,651, EP 0,345,242, WO 91/02805 számú szabadalmi leírás; Berkner: *Biotechniques* 6, 616-627 (1988); Rosenfeld és mtsai: *Science* 252, 431-434 (1991); Kolls és mtsai: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91, 215-219 (1994); Kass-Eisler és mtsai: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 90, 11498-11502 (1993); Guzman és mtsai: *Circulation* 88, 2838-2848 (1993); Guzman és mtsai: *Cir. Res.* 73, 1202-1207 (1993)]. A DNS ilyen expressziós rendszerekbe való beépítésének technikai jól ismertek a szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember számára. A DNS lehet "pucér" is, amint azt a szakirodalomban is ismertetik [Ulmer és mtsai: *Science* 259, 1745-1749 (1993); összefoglaló: Cohen: *Science* 259, 1691-1692 (1993)]. A pucér DNS felvételét fokozhatjuk, ha a DNS-t biológiailag lebomló gyöngyökbe visszük be, amik hatékonyan bevihetők a sejtekbe. Az nyilvánvaló, hogy egy vakcina tartalmazhat mind polinukleotid, mind polipeptid komponenst. Az ilyen vakcinák fokozott immunválaszt biztosíthatnak.

Az nyilvánvaló, hogy egy vakcina tartalmazhatja az itt biztosított polinukleotidok és fúziós polipeptidek gyógyászatilag elfogadható sóit. Az ilyen sókat előállíthatjuk gyógyászatilag elfogadható nem-toxikus bázisokból, beleértve a szerves bázisokat (azaz például a primer, szekunder és tercier aminokat és bázikus aminosavakat) és a szervetlen bázisokat (azaz például nátrium-, kálium-, lítium-, ammónium-, kalcium- és magnézium-sókat).

Miközben bármilyen, a szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember számára ismert hordozó használható a jelen találmány szerinti gyógyászati készítményekben, a hordozó tí-



pusa függ a beadás módjától. A jelen találmány szerinti készítmények bármilyen megfelelő beadási módhoz formulálhatók, beleértve például a topikális, orális, intravénás, intrakraniális, intraperitoneális, szubkután vagy intramuszkuláris beadási módokat. A parenterális beadáshoz, azaz például a szubkután injekcióhoz a hordozó előnyösen tartalmaz vizet, sóoldatot, zsírt, viaszt vagy puffert. Az orális beadáshoz az előzőkben említett hordozók bármelyike, vagy egy szilárd hordozó, azaz például mannit, laktóz, keményítő, magnézium-sztearát, szaccharin nátriumsó, talkum, cellulóz, glükóz, szacharóz és magnézium-karbonát használható. Biológiailag lebomló mikrogömbök, (azaz például polilaktát poliglükolat) is használhatók hordozóként a jelen találmány szerinti gyógyászati készítményekhez. A lebomló mikrogömböket például a 4,897,268, 5,075,109, 5,928,647, 5,811,128, 5,820,883 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetik. A HER-2/neu fúziós fehérje a biológiailag lebomló mikrogömbbe kapszulázható, vagy a mikrogömb felszínéhez köthető. Az egyik megvalósítási mód szerint egy itt ismertetett ECD-ICD fúziós fehérjét kapszulázhatunk. Emellett, vagy egy másik változat szerint, egy itt ismertetett ECD-PD fúziós fehérjét egy biológiailag lebomló mikrogömbbe kapszulázunk. A mikrogömb tartalmazhat például mind egy ECD-ICD fúziós fehérjét, mind egy ECD-PD fúziós fehérjét. A mikrogömb mérete előnyösen kisebb 25 μm -nél, előnyösen körülbelül 1-10 μm . A liposzómákba való kapszulázást például a 4,235,877 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetik.

Az ilyen készítmények tartalmazhatnak puffereket (azaz például semlegesre puffereelt sóoldatot vagy foszfáttal puffereelt só-



oldatot), szénhidrátokat (azaz például glükózt, mannózt, szacharózt vagy dextránokat), mannitot, fehérjéket, polipeptideket vagy aminosavakat, azaz például glicint, antioxidánsokat, bakteriosztatikumokat, kelátképző ágenseket, azaz például EDTA-t vagy glutationt, adjuvánsokat (azaz például alumínium-hidroxidot) a készítményt izotóniássá, hipotóniássá vagy a beteg vérével enyhén hipertóniássá tevő oldott anyagot, szuszpendáló ágenseket, sűrítő ágenseket és/vagy konzerválószeret. Egy másik változat szerint a jelen találmány szerinti készítmények liofilizátum formájában is kiszerezhetők. A vegyületeket liposzómákba is kapszulázhatjuk, jól ismert technológia alkalmazásával.

A jelen találmány szerinti vakcinákban a számos különböző immunválasz fokozó vagy immunstimuláns anyag közül bármelyik használható. Használható például egy adjuváns. A legtöbb adjuváns tartalmazhat egy olyan anyagot, amit arra terveztek, hogy az antigént megvédje a gyors katabolizálódástól, azaz például alumínium-hidroxidot vagy ásványolajat, vagy immunválasz stimulátort, azaz például lipid A-t, *Bordetella pertussis* vagy *Mycobacterium tuberculosis* eredetű fehérjét. A használható adjuvánsok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők, mint például a Freund féle komplett adjuváns és a Freund féle inkomplett adjuváns (Difco Laboratories, Detroit, MI); a Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); az AS-2 (SmithKline Beecham); az alumíniumsók, azaz például az alumínium-hidroxid gél (alum) vagy az alumínium-foszfát; kalcium-, vas- vagy cinksók; acetilezett tirozin oldhatatlan szuszpenziója; acetilezett cukrok; kationosan vagy anionosan derivatizált poliszacharidok; polifoszfazének; biológiailag lebomló mikrogömbök,



monofoszforil Lipid A és quil A. A citokinek is, azaz például a GM-CSF vagy az interleukin-2, interleukin-7 vagy interleukin-12 is használható adjuvánsként.

Az itt biztosított vakcinákban az adjuváns készítményt előnyösen úgy tervezzük meg, hogy főleg Th 1 típusú immunválaszt indukáljanak. A Th1-típusú citokinek (azaz például az interferon- γ , tumor nekrozis faktor- α , interleukin-2 és interleukin-12) magas szintjei hajlanak arra, hogy a beadott antigénnel szembe-
ni, sejtek által közvetített immunválaszokat indukáljanak. Egy itt előállított vakcina alkalmazását követően a beteg olyan immunválaszt támogat, ami mind Th1- mind Th2-típusú immunválaszokat tartalmaz. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint, amiben egy válasz főleg Th1-típusú, a Th1-típusú citokinek szintje jobban megnő, mint a Th2-típusú citokineké. Ezeknek a citokineknek a szintjeit standard esszével könnyen megbecsülhetjük. A citokin családok összefoglalását a szakirodalomban publikálták [Mosmann és Coffman: *Ann. Rev. Immunol.* **7**, 145-173 (1989)].

A főleg Th1-típusú válasz kiváltásában használható, előnyben részesített adjuvánsok közé tartozik a monofoszforil lipid A, előnyösen a 3-de-O-acilezett monofoszforil lipid A (3D-MPL) kombinálása egy alumíniumsóval. Az MPL adjuvánsok a Corixa Corporation-tól szerezhetők be (Hamilton, MT; lásd a 4,436,727, 4,877,611, 4,866,035 és 4,912,094 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírások). A CpG-t tartalmazó oligonukleotidok (amikben a CpG dinukleotid nincs metilezve) szintén indukálnak egy főleg Th1 választ. Az ilyen oligonukleotidok jól ismertek, és például a WO 96/02555 és WP 99/33488 számú szabadalmi leírásban ismertetik őket. Immunstimuláns DNS



szekvenciákat is ismertettek [Sato és mtsai: Science 273, 352 (1996)]. Egy másik előnyben részesített adjuváns a szaponin, előnyösen a QS21 (Aquila, Amerikai Egyesült Államok), ami használható önmagában vagy más adjuvánsokkal kombinálva. Egy erősített rendszer például magában foglalja egy monofoszforil lipid A és egy szaponin származék kombinálását, azaz például a QS21 és a 3D-MPL kombinálását, a WO 94/00153 számú szabadalmi leírásban ismertetett módon, vagy egy kevésbé reakcióképes összetételt, ahol a QS21-t koleszterinnel oltják ki, ahogy azt a WO 96/33739 számú szabadalmi leírásban ismertetik. Más előnyben részesített készítmény olaj-a-vízben emulziót és tokoferolt tartalmaz. Egy különösen potens adjuváns készítmény az, ami QS21-et, 3D-MPL-t és tokoferolt tartalmaz olaj-a-vízben emulzióban, ezt a WO 95/17210 számú szabadalmi leírásban ismertették. A QS21-et és a 3D-MPL-t is leírták az EP 671 948 B1 számú szabadalmi leírásban.

Más előnyben részesített adjuváns például a Montanide ISA 720 (Seppic, Franciaország), a SAF (Chiron, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok), az ISCOMS (CSL), az MF-59 (Chiron), az adjuvánsok SBS sorozata (azaz például az SBAS-2 vagy az SBAS-4, beszerezhető a SmithKline Beecham-tól, Rixensart, Belgium), a Detox (Corixa Corporation, Hamilton, MT), az RC-529 (Corixa USA), és az aminoalkil-glükózaminid-4-foszfátok (AGP-k).

Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint az adjuváns az SBAS-2 (lásd például az EP 735898B1 számú szabadalmi leírást).

Az ebben a találmányban biztosított bármelyik vakcinát jól ismert módszerekkel lehet előállítani, amik az antigén, az immunválasz fokozó és egy megfelelő hordozó vagy töltőanyag kom-



binációját eredményezik. Az itt ismertetett készítményeket beadhatjuk egy késleltetett felszabadulású készítmény részeként (azaz egy kapszula vagy szivacs részeként, ami a beadás után elvégzi a vegyület lassú felszabadulását). Az ilyen készítményeket általában jól ismert technológiával lehet előállítani [Coombes és mtsai: *Vaccine* 14, 1429-1438 (1996)], és például orálisan, rektálisan vagy szubkután implantátum formájában, vagy a kívánt célpontba beültetett implantátum formájában adhatjuk be. A késleltetett felszabadulású készítmények tartalmazhatnak egy polipeptidet, polinukleotidot vagy ellenanyagot is, egy hordozó mátrixban szuszpendálva, és/vagy egy sebességmeghatározó membránnal körülvett térben tartva.

Az ilyen készítményekben használható hordozók biokompatibilisak, és lehetnek biológiailag lebomlók is; a készítmény előnyösen az aktív komponens felszabadulását viszonylag állandó szinten biztosítja. Az ilyen hordozók lehetnek poli(laktid-koglikolid) mikrorészecskék, vagy poliakrilát, latex, keményítő, cellulóz és dextrán mikrorészecskék. Más késleltetett felszabadulású hordozók lehetnek szupramolekuláris biovektorok, amik nem-folyékony hidrofil magot (azaz például egy keresztkötéses poliszacharidot vagy oligoszacharidot) tartalmaznak, valamint adott esetben egy külső réteget, ami amfifil vegyületet, azaz például egy foszfolipidet tartalmaz (lásd az 5,151,254 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírást, valamint a WO 94/20078, WO/94/23701 és WO 96/06638 számú szabadalmi leírást). Az egy késleltetett felszabadulású készítményben levő aktív vegyület mennyisége függ a beültetés helyétől, a felszabadulás sebességétől és várt időtartamától, valamint a kezelendő vagy megelőzendő állapot természetétől.

A számos különböző hordozó közül bármelyik használható egy gyógyászati készítményben és vakcinában, ami megkönnyíti a tumorsejteket megcélzó antigén-specifikus immunválasz kialakulását. A bejuttató hordozók közé tartoznak az antigént prezentáló sejtek (APC-k), azaz például a dendrites sejtek, a makrofágok, a B-sejtek, a monociták és más sejtek, amik úgy változtathatók meg biotechnológiai módszerekkel, hogy hatékony APC-k legyenek. Az ilyen sejtek lehetnek, de nem szükségszerűen, genetikailag módosítottak, hogy fokozzuk az antigén-prezentáló képességüket, hogy javítsuk a T-sejt válasz aktiválását és/vagy fenntartását, hogy *per se* antitumor hatással rendelkezzenek, és/vagy immunológiailag kompatibilisek legyenek a befogadóval (azaz illeszkedjen a HLA haplotípusuk). Az APC-ket általában számos különböző biológiai folyadékból és szervből izolálhatjuk, beleértve a tumor és peritumorális szöveteket, és lehetnek autológok, allogén, szingén vagy xenogén sejtek.

A jelen találmány bizonyos előnyben részesített megvalósítási módjaiban dendrit sejteket vagy azok elősejtjeit használják antigént prezentáló sejtekként. A dendrites sejtek erősen potens APC-k [Banchereau és mtsai: *Nature* **392**, 245-251 (1998)], és kimutatták róluk, hogy hatékony fiziológiás adjuvánsok, profilaktikus vagy terápiás antitumor immunitást váltva ki [Timmermann és mtsai: *Ann. Rev. Med.* **50**, 507-529 (1999)]. Általánosságban, a dendrit sejteket a következők alapján lehet azonosítani: tipikus alakjuk (csillag alakú *in situ*, *in vitro* látható jelentős citoplazmatikus folyamatokkal (dendritek)), az a képességük, hogy nagy hatékonysággal vesznek fel folyamatot és mutatnak be antigéneket, valamint képesek a természetes T-sejt válaszok aktiválására. A dendrites sejtek természetesen úgy változtathatók meg biotech-

nológiai módszerekkel, hogy olyan specifikus sejtfelszíni receptorokat vagy ligandumokat expresszáljanak, amik általában nem találhatók meg *in vivo* vagy *ex vivo* a dendrit sejteken, és az ilyen módosított sejtek is megfontolás tárgyát képezik a jelen találmányban. A dendrit sejtek alternatívájaként a szekretált vezikulumok antigén-töltött dendrit sejtek (ezeket nevezik exoszómáknak) használhatók egy vakcinában [Zitvogel és mtsai: Nature Med. 4, 594-600 (1998)].

A dendrit sejteket és elősejtjeiket periferiális vérből, csontvelőből tumorba beszűrődő sejtekből, peritumorális szövetekbe beszűrődő sejtekből, nyirokcsomókból, lépéből, bőrből, köldökzsinór vérből vagy bármilyen más megfelelő szövetből vagy folyadékból izoláljuk. A dendrit sejtek például *ex vivo* differenciálódhatnak citokinek, azaz például GM-CSF, interleukin-4, interleukin-13 és/vagy tumor nekrozis faktor- α kombinációjának periferiális vérből gyűjtött monocitákból készített tenyészetéhez való hozzáadásával. Egy másik változat szerint CD34 pozitív sejteket gyűjtenek periferiális vérből, köldökzsinór vérből vagy csontvelőből, és ezek differenciálódnak dendrit sejtekké, a tenyészet közegéhez GM-CSF, interleukin-3, tumor nekrozis faktor- α , DC40 ligandum, LPS, flt3 ligandum és/vagy más vegyületek kombinációját adva, amik a dendrit sejtek érését és szaporodását indukálják.

A dendrit sejteket az egyszerűség kedvéért „éretlen” és „érett” sejtekre osztjuk, ami lehetőséget ad arra, hogy két jól jellemzett fenotípust megkülönböztessünk egymástól. Azonban ez a nevezéktan nem tekinthető úgy, hogy a differenciálódás minden lehetséges közbenső állapotát kizárjuk. Az éretlen dendrites sejteket úgy jellemezzük, mint antigént prezentáló sejteket,



amiknek nagy az antigén-felvételi és processzási kapacitásuk, ami korrelál az Fc γ receptor és mannóz receptor magasszintű expressziójával. Az érett fenotípust tipikus esetben ezeknek a markereknek az alacsony szintű expressziója jellemzi, viszont a T-sejt aktiválásért felelős sejtfelszíni molekulák, azaz például az MHC I-es és II-es osztálya, az adhéziós molekulák (azaz például a CD54 és CD11) és a ko-stimuláló molekulák (azaz például a CD40, CD80, CD86 és 4-1BB) magas szinten expresszálódnak.

Az APC-eket általában a jelen találmány szerinti fúziós fehérjét (vagy annak egy variánsát) kódoló polinukleotiddal transzfektáljuk, oly módon, hogy a fúziós fehérje, vagy annak variánsa a sejt felszínén expresszálódjon. Az ilyen transzfekció lejátszódhat *ex vivo*, és az ilyen transzfektált sejteket tartalmazó készítmény vagy vakcina használható azután terápiás célokra, az itt ismertetett módon. Egy másik változat szerint egy dendrit vagy más antigént prezentáló sejtet célzó génbejuttató hordozó adható be egy betegnek, ami *in vivo* létrejövő transzfekciót eredményez. A dendrit sejtek *in vivo* és *ex vivo* transzfekcióját például általában bármelyik, a szakterületen ismert módszerrel végrehajthatjuk, például a WO 97/24447 számú szabadalmi leírásban ismertetett módszerrel, vagy Mahvi és munkatársai génpuska megközelítési módjával [Mahvi és mtsai: *Immunology and Cell Biology* 75, 456-460 (1997)]. A dendrit sejtek antigénnel való feltöltését úgy érhetjük el, hogy a dendrit sejteket vagy azok őssejtjeit a számunkra érdekes fúziós fehérjével, DNS-sel (pucér, vagy plazmid vektorban levő DNS) vagy RNS-sel inkubáljuk; vagy fúziós fehérjét expresszáló rekombináns baktériummal vagy vírussal (azaz például vakcinia-, csirkepestis-, adenovírus- vagy lentivírus vektorral). A feltöltés előtt a számunkra érdekes fúziós



fehérjét kovalens kötéssel konjugálhatjuk egy immunológiai partnerhez (azaz például egy hordozó molekulához), ami T-sejt segítséget biztosít. Egy másik változat szerint egy dendrit sejtet nem-konjugált immunológiai partnerrel impulzus jelezhetjük, külön, vagy a fúziós fehérje jelenlétében.

A vakcinákat és gyógyászati készítményeket egységdózis vagy multidózis konténerekben szerelhetjük ki, azaz lezárt ampullákban vagy fiolákban. Az ilyen konténerek előnyösen hermetikusan zártak, hogy a készítmény a felhasználásig steril maradjon. Általában a készítményeket tárolhatjuk szuszpenzió, oldat vagy emulzió formájában, olajos vagy vizes hordozóban. Egy másik változat szerint egy vakcina vagy gyógyászati készítmény fagyasztva szárított állapotban tárolható, amihez csak az kell, hogy közvetlenül felhasználás előtt steril folyékony hordozót adjunk hozzá.

A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy egy vakcinához a HER-2/neu fúziós fehérje vagy nukleinsav előállítható szintetikusán, vagy a természetes származékai is lehetnek.

Immunválasz a jelen találmány szerinti fúziós fehérjék ellen

A. A jelen találmány szerinti fúziós fehérjék elleni immunválasz kimutatása

A jelen találmány egyik megvalósítási módja szerint a HER-2/neu fúziós fehérjéket (vagy a HER-2/neu fúziós fehérjéket kódoló polinukleotidokat használjuk a HER-2/neu fehérje elleni immunválasz generálására, beleértve azt is, ami egy olyan rosszindulatú betegség esetében expresszálódik, amihez a HER-2/neu



onkogénnek köze van. Az ilyen rosszindulatú betegségek reprezentatív példája az emlő-, petefészek-, vastagbél-, tüdő- és prosztataraák. A HER-2/neu fehérje elleni immunválasz, ha HER-2/neu fúziós fehérjék generálódott, hosszú életű lehet és az immunizálás után hosszú idővel is kimutatható, függetlenül attól, hogy a vizsgálat időpontjában a fehérje jelen van-e a testben vagy nincs. Az ellenanyagokra vagy a HER-2/neu fúziós fehérjére adott reakció alapján generált HER-2/neu fehérje elleni immunválaszt úgy lehet kimutatni, hogy vizsgáljuk a CD4⁺ vagy CD8⁺ T-sejtek specifikus aktiválódásának meglétét, hiányát vagy fokozódását. Az immunizált egyedből standard technikákkal (azaz például periferiális vér limfociták Ficoll/Hypaque sűrűséggradiens centrifugálásával) izolált T-sejteket egy HER-2/neu fúziós fehérjével inkubáljuk. A T-sejteket például 2-9 napig (tipikus esetben 4 napig) *in vitro* inkubálhatjuk 37 °C-on egy HER-2/neu fúziós fehérjével (tipikus esetben 5 µg/ml teljes fehérje vagy növekvő számú, HER-2/neu fehérjét szintetizáló sejt). Kívánatos lehet a T-sejt minta egy másik alikvot részét inkubálni a HER-2/neu fúziós fehérje nélkül, ez a kontroll.

A CD4⁺ vagy CD8⁺ T-sejtek specifikus aktivitását számos különböző módszerrel lehet kimutatni. A specifikus T-sejt aktiválás kimutatásának módszerei közé tartozik a T-sejtek szaporodásának kimutatása, a citokinek (azaz például limfokinek) termelése, vagy citolitikus aktivitás generálása (azaz a HER-2/neu fúziós fehérjére specifikus T-sejtek generálása). a CD4⁺ T-sejtek esetében a specifikus T-sejt aktiválás kimutatásának előnyben részesített módszere a T-sejtek szaporodásának kimutatása. A CD8⁺ T-sejtek esetében a specifikus T-sejt ak-



tiválás kimutatásának előnyben részesített módszere a citolitikus aktivitás kimutatása.

A T-sejtek szaporodását számos különböző ismert technikával mutathatjuk ki. A T-sejtek szaporodását a DNS szintézis sebességének mérésével lehet kimutatni. A szaporodásra stimulált T-sejtekben megnő a DNS szintézis sebessége. A DNS szintézis sebességének tipikus módja például a T-sejt tenyészet impulzus jelölése triciált timidinnel, egy nukleozid prekuzorral, ami beépül az újonnan szintetizált DNS-be. A beépült triciált timidin mennyiségét folyadék szcintillációs spektrofotométerrel határozzuk meg. A T-sejt szaporodás kimutatásának más módja például az interleukin-2 (IL-2) termelés, a Ca^{2+} fluxus vagy a festék, azaz a 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium felvétel növekedésének mérése. Egy másik változat szerint a limfokinek (azaz például az interferon-gamma) szintézise, vagy az intakt p185^{HER-2/neu} fehérjére reagáló T-sejtek relatív száma meghatározható.

B. A jelen találmány szerinti fúziós fehérjék elleni ellenanyag-termelés kimutatása

A jelen találmány tárgyát olyan HER-2/neu fúziós fehérjék is képezik, amik amellett, hogy immunogének a T-sejtekre, úgy tűnik, hogy a B-sejteket stimulálják, hogy olyan ellenanyagokat termeljenek, amik képesek felismerni a HER-2/neu fúziós fehérjéket. Az ilyen ellenanyagok kimutatása egy másik módszer egy olyan rosszindulatú betegség kimutatására, amiben a HER-2/neu onkogén kötődik a rosszindulatú betegséghez. A HER-2/neu fúziós fehérjékre specifikus ellenanyagokat (azaz azokat, amik körülbelül 10^7 liter/mól vagy jobb kötési affinitást mutat-



nak) a HER-2/neu fúziós fehérjékhez, számos különböző testfolyadékban meg lehet találni, beleértve például a szérumot és az aszcitesz folyadékot. Röviden, egy testfolyadék mintát izolálunk melegvérű állatból, azaz például emberből, aminél meg kell határozni, hogy vannak-e jelen a fúziós fehérjére specifikus ellenanyagok. A testfolyadékot olyan körülmények között, és annyi ideig inkubáljuk a HER-2/neu fúziós fehérjékkel, ami lehetővé teszi immunkomplexek képződését a HER-2/neu fúziós fehérjék és a fúziós fehérjére specifikus ellenanyagok között. Például egy testfolyadékot és a HER-2/neu fúziós fehérjét 46 °C-on inkubáljuk 24-48 óra hosszat. Az inkubálást követően a reakcióelegyet megvizsgáljuk, hogy tartalmaz-e immunkomplexeket. Egy vagy több, a HER-2/neu fúziós fehérje és a HER-2/neu fúziós fehérjére specifikus ellenanyagok között képződő immunkomplex kimutatását számos különböző, ismert technikával végezhetjük el, azaz például radioimmunszéssel (RIA) és enzimhez kötött immunszorbens vizsgálattal (ELISA).

A megfelelő immunesszék közé tartozik a dupla monoklonális ellenanyag szendvics immunesszé technika [David és mtsai: 4,376,110 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás]; a monoklonális-poliklonális ellenanyag szendvics esszék [Wide és mtsai *In: Radioimmunassay Methods*, szerk.: Kirkham és Hunter, E. és S. Livingstone, Edinburgh (1970)], Gordon és munkatársai Western blot módszere (4,452,901 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás), a jelölt ligandum immunprecipitációja [Brown és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* 255,4980-4983 (1980)], az enzimhez kötött immunszorbens vizsgálatok a leírás szerint [Raines és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* 257, 5154-5160 (1982)], az immuncitoké-



miai módszerek, beleértve fluorokrómok használatát [Brooks és mtsai: Clin. Exp. Immunol. 39, 477 (1980)], és az aktivitás neutralizálása [Bowen-Pope és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 81, 2396-2400 (1984)], amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk. Az előzőekben ismertetett immunesszék mellett számos különböző immunesszé is hozzáférhető, beleértve azokat, amiket a 3,817,827, 3,850,752, 3,901,654, 3,935,074, 3,984,33, 3,996,345, 4,034,074 és 4,098,876 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásokban ismertetnek, amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk.

Kimutatási célokra a HER-2/neu fúziós fehérjék (azaz antigének) lehetnek jelzettek vagy jelzetlenek. Ha jelzetlenek, akkor a fúziós fehérjék az agglutinációs esszékben használhatók. Emellett a jelzetlen fúziós fehérjék az immunkomplexekkel reagáló jelzett molekulákkal kombinálva használhatók, vagy jelzett ellenanyagokkal (szekunder ellenanyagokkal) kombinálva, amik a HER-2/neu fúziós fehérje elleni ellenanyaggal, azaz az immunglobulinra specifikus ellenanyagokkal reagálnak. Egy másik változat szerint a fúziós fehérje lehet közvetlenül jelölve. Ha jelölve van, akkor a riporter csoport tartalmazhat például radioaktív izotópokat, fluorofórokat, enzimeket, lumineszkáló szereket, festékrészecskéket és hasonlókat. Az ilyen és más jelölések jól ismertek a szakirodalomban, és az alábbi Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentésekben ismertetik: 3,766,162; 3,791,932; 3,817,837; 3,996,345 és 4,233,402, amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk.

Tipikusan egy ELISA esszében a számunkra érdekes fúziós fehérjét egy mikrotiter luk felületére adszorbeáltatjuk. A felszínen



levő reziduális fehérjekötő helyek azután blokkolhatók egy megfelelő ágenssel, azaz például szarvasmarha szérum-albuminnal (BSA), hővel inaktivált normál kecskeszérummal (NGS), vagy BLOTTO-val (zsírmentes tejpor pufferelt oldata, ami tartalmaz konzerválószeret, sókat és habzástgátló ágenszt). A lukat azután egy olyan mintával inkubáljuk, amiről elképzelhető, hogy specifikus ellenanyagot tartalmaz. A mintát azután használhatjuk higítatlanul, vagy ennél gyakrabban lehet higítva is, általában egy pufferelt oldatban, ami kismennyiségű (0,1-5,0 tömegszázalék) fehérjét, azaz például BSA-t, NGS-t vagy BLOTTO-t tartalmaz. Miután elég hosszú ideig inkubáltuk ahhoz, hogy a specifikus kötődés lejátszódjon, a lukat mossuk, hogy eltávolítsuk a megkötetlen fehérjét, majd egy riporter csoporttal jelzett fajspecifikus immunglobulinra specifikus ellenanyaggal inkubáljuk. A riporter csoportot számos különböző enzim közül választhatjuk ki, beleértve a tormaperoxidázt, a béta-galaktozidázt, az alkalikus foszfatázt és a glükóz oxidázt. Elegendő időt hagyunk arra, hogy a specifikus kötődés lejátszódjon, majd a lukat ismét mossuk a megkötetlen konjugátum eltávolítására, majd az enzim szubsztrátját hozzáadjuk. Hagyjuk hogy kifejlődjön a szín, majd a luk tartalmának optikai sűrűségét vizuálisan vagy műszeresen határozzuk meg.

A jelen találmány egyik előnyben részesített megvalósítási módja szerint a riporter csoport a számunkra érdekes HER-2/neu fúziós fehérjéhez kapcsolódik. Az immunkomplexek kimutatási lépése magában foglalja lényegében az összes megkötetlen HER-2/neu fúziós fehérje eltávolítását, majd a riporter csoport jelenlétének vagy távollétének kimutatását.



Egy másik előnyben részesített megvalósítási mód szerint a riporter csoportot egy második ellenanyaghoz kapcsoljuk, ami képes a HER-2/neu fúziós fehérjékre specifikus ellenanyagokhoz. Az immunkomplexek kimutatása a következő lépésekből áll: a) lényegében minden megkötetlen ellenanyag eltávolítása, b) a második ellenanyag hozzáadása, c) lényegében az összes megkötetlen második ellenanyag eltávolítása, és d) a riporter csoport jelenlétének vagy távollétének kimutatása. Ha a HER-2/neu fúziós fehérjékre specifikus ellenanyag emberekből származik, akkor a második ellenanyag egy anti-humán ellenanyag.

Az immunkomplexek kimutatásának harmadik megvalósítási módja szerint egy riporter csoportot kapcsolunk egy olyan molekulához, ami képes az immunkomplexekhez kötődni. A kimutatás az alábbi lépésekből áll: a) a molekula hozzáadása, b) lényegében az összes megkötetlen molekula eltávolítása, és végül c) a riporter csoport jelenlétének vagy távollétének kimutatása. Az immunkomplexekhez kötődni képes molekulák egyik példája a protein A.

A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy a jelen találmányban az immunkomplexek kimutatására számos különböző módszer használható. A bármelyik módszerben használható riporter csoportok közé tartoznak például a radioaktív izotópok, a fluorofórok, az enzimek, lumineszkáló szerek és festékrészecskék.

A jelen találmány egy rokon megvalósítási módja szerint a HER-2/neu fúziós fehérjék és a testfolyadékban levő, a HER-2/neu fúziós fehérjékre specifikus ellenanyagok között kialakult immunkomplexek kimutatása használható a rákterápia haté-



konyságának ellenőrzésére, ami magában foglal egy HER-2/neu fúziós fehérjét, egy olyan rosszindulatú betegség esetében, amelyben a HER-2/neu onkogén szerepet játszik. Az egyedekből a terápia megindítása előtt vagy után vett testfolyadék minták az előzőekben említett módszerekkel elemezhetők, hogy vannak-e bennük immunkomplexek. Röviden, a mindkét mintában kimutatott immunkomplexeket hasonlítjuk össze. A második mintában (a terápia megindítása utáni mintában) az immunkomplexek számának az első (terápia előtti minta) mintában mérthez viszonyított lényeges változása sikeres terápiára utal.

Rácterápia

A jelen találmány további megvalósítási módjai szerint az itt ismertetett készítmények használhatók rák, azaz például emlőrák, petefészekrák, vastagbélrák, tüdőrák és prosztatatarák immunterápiájában. Az ilyen módszerekben a gyógyászati készítményeket és vakcinákat egy betegnek adjuk be. A továbbiakban a „beteg” szakkifejezés bármilyen melegvérű állatot, előnyösen embert jelent. A beteg vagy rákos, vagy nem. Ennek megfelelően az előzőekben említett gyógyászati készítményeket és vakcinákat használhatjuk egy rákos betegség kifejlődésének megakadályozására, vagy rákban már megbetegedett betegek kezelésére. Egy rákos betegség a szakterület általánosan elfogadott kritériumok alapján diagnosztizálható, beleértve egy rosszindulatú tumor jelenlétét is. A gyógyászati készítményeket és vakcinákat vagy a primer tumorok műtéti eltávolítása előtt vagy után, és/vagy kezelése, azaz például radioaktív izotópos terápia vagy hagyományos kemoterápiás gyógyszerek beadása előtt vagy után adhatjuk be. A beadást végrehajthatjuk bármilyen megfelelő módszerrel, bele-

értve az intravénás, intraperitoneális, intramuszkuláris, szubkután, intranazális, intradermális, anális, vaginális, topikális, szublingvális és orális módszereket.

Néhány megvalósítási mód szerint az immunterápia lehet aktív immunterápia, amiben a kezelés az endogén gazdaszervezet immunrendszerének *in vivo* stimulálásán alapul, hogy a tumorokkal reagáljon, immunválaszt módosító ágensek (azaz például az ebben a találmányban biztosított fúziós polipeptidek és polinukleotidok) beadásával.

Más megvalósítási módok szerint az immunterápia lehet passzív immunterápia, amiben a kezelés magában foglalja a megalapozott tumor-immun reakcióképességgel rendelkező ágensek (azaz effektor sejtek vagy ellenanyagok) bejuttatását, amik közvetlenül vagy közvetve befolyásolják az antitumor hatásokat, és nem szükségszerűen függenek az intakt gazdaszervezet immunrendszerétől. Effektor sejtek lehetnek például a T-sejtek, amint azt az előzőkben tárgyaltuk, a T-limfociták (azaz például a CD8⁺ citotoxikus T-limfociták és CD4⁺ T-segítő, tumorba beszűrődő limfociták), az ölösejtek (azaz például a természetes ölösejtek és a limfokinnel aktivált ölösejtek), a B-sejtek és az antigént prezentáló sejtek (azaz a dendrit sejtek és makrofágok), amik az itt biztosított fúziós fehérjéket expresszálnak. Az itt ismertetett fúziós polipeptidre specifikus T-sejt receptorokat és ellenanyag receptorokat klónozzhatjuk, expresszáltathatjuk és átvihetjük más vektorokba vagy effektor sejtekbe, az adoptív immunterápiához. Az itt biztosított fúziós polipeptideket is használhatjuk ellenanyagok vagy anti-idiotípusos ellenanyagok előállítására (lásd az előzőkben ismertetett eljárást és a 4,918,164 számú Amerikai



Egyesült Államok-beli szabadalmi leírást) a passzív immunterápiához.

Az effektor sejteket általában az itt ismertetett *in vitro* szaporítással megfelelő mennyiségben előállíthatjuk az adoptív immunterápiához. Az egyedi antigén-specifikus effektor sejtek számának több milliárdra való expandálásához szükséges tenyésztési körülmények, az *in vivo* antigén felismerés megtartásával, a szakterületen jól ismertek. Az ilyen *in vitro* tenyésztési körülmények tipikus esetben az antigénnel való intermittáló stimulálást használják, gyakran citokinek (azaz például interleukin-2) és nem-osztódó tápláló sejtek jelenlétében. Amint azt az előzőkben jeleztük, az itt biztosított immunreaktív fúziós polipeptidek használhatók arra, hogy gyorsan megnöveljük az antigén-specifikus T-sejt tenyészeteket, azzal a céllal, hogy az immunterápiához elegendő számú sejtet kapjunk. Pontosabban, antigént prezentáló sejteket, azaz például dendrit, makrofág vagy B-sejteket impulzus-jelezhetünk immunreaktív fúziós polipeptidekkel, vagy transzfektálhatunk egy vagy több polinukleotiddal, a szakterületen jól ismert standard technikák alkalmazásával. Az antigént prezentáló sejteket például egy olyan polinukleotiddal transzfektálhatjuk, aminek olyan promotere van, ami alkalmas arra hogy fokozza az expressziót egy rekombináns vírusban vagy más expressziós rendszerben. A terápiában használandó tenyésztett effektor sejteknek képeseknek kell lenniük arra, hogy széles körben növekedjenek és szétoszlojanak, valamint *in vivo* hosszú ideig képesek legyenek túlélni. A vizsgálatok kimutatták, hogy a tenyésztett effektor sejtek indukálhatók arra, hogy *in vivo* növekedjenek, és hosszú ideig, nagy számban életben maradjanak interleukin-2-vel kiegészített antigénnel való stimu-



lálás hatására [Cheever és mtsai: *Immunological Reviews* 157, 177 (1997)].

Egy másik változat szerint egy itt említett fúziós polipeptidet expresszázó vektort be lehet juttatni egy betegből vett antigént prezentáló sejtekbe, majd *ex vivo* klonálisan szaporíthatjuk, hogy ugyanabba a betegbe visszaültessük. A transzfektált sejteket a szakterületen ismert bármelyik módszerrel visszajuttathatjuk a betegbe, előnyösen steril formában, intravénás, intrakavitális, intraperitoneális vagy intratumorális beadást alkalmazva.

Az itt ismertetett terápiás készítmény beadásának útja és gyakorisága, valamint a dózisa, egyedről egyedre változik, és standard technikákkal könnyen meghatározhatjuk. A gyógyászati készítményeket és vakcinákat általában beadhatjuk injekcióval (azaz például intrakután, intramuszkuláris, intravénás vagy szubkután injekcióval), intranazálisan (azaz például belégzéssel) vagy orálisan. Egy 52 hetes periódusban előnyösen 1-10 dózist lehet beadni. Előnyösen 6 dózist lehet beadni, egyhónapos intervallumokban, és időnként erősítő injekciókat adhatunk be. Eltérő protokollok használhatók az egyes betegekhez. A megfelelő dózis olyan mennyiségű vegyület, amit ha az előzőekben ismertetett módon beadunk, akkor képes anti-tumor immunválaszt kelteni, és legalább 10-50%-kal magasabb az alap (azaz kezeletlen) szintnél. Az ilyen választ úgy követhetjük, hogy egy betegben mérjük az anti-tumor ellenanyagok mennyiségét, vagy mérjük a beteg tumorsejtjeinek *in vitro* pusztítására képes citolitikus effektor sejtek vakcina-dependens generálását. Az ilyen vakcináknak arra is képeseknek kell lenniük, hogy a nem-vakcinált betegekkel összehasonlítva a vakcinált betegekben



olyan immunválaszt okozzanak, ami jobb klinikai eredményhez vezet (azaz például gyakoribb remissziók, teljes, vagy részleges, vagy hosszabb betegségmentes túlélés). Általában az egy vagy több fúziós polipeptidet tartalmazó gyógyászati készítmények és vakcinák esetében a dózisosokban levő egyes fúziós fehérjék mennyisége körülbelül 1 μg és 5 mg között van, előnyösen 100 μg és 5 mg között, és legelőnyösebben 5-250 μg per kg gazdaszervezet. A megfelelő dózisosok mérete a beteg méretétől függően változik, de általában körülbelül 0,1-5 ml lehet.

Egy kiindulási vagy primer immunizálást előnyösen egy olyan HER-2/neu fúziós fehérjével hajthatunk végre, amiben legalább egy ECD és/vagy egy ICD vagy PD van, és egy következő, vagy erősítő immunizálást egy olyan HER-2/neu fúziós fehérjével hajthatunk végre, ami legalább egy ECD és/vagy egy ICD vagy PD fehérjét tartalmaz. Az immunizáláshoz előnyben részesített ECD-ICD és/vagy ECD-PD fúziós fehérjék közé az itt ismertetett fehérjék tartoznak. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy a jelen találmányban megfontoltuk egy intakt HER-2/neu fúziós fehérje használatát, valamint a HER-2/neu fúziós fehérje több különböző peptidre osztását. Sem az érintetlen p185^{HER-2/neu} fehérjét, sem a teljes HER-2/neu ECD domén (vagy a HER-2/neu ECD domén egy része) aminosav szekvenciájával rendelkező peptidet nem használjuk önmagában az immunizáláshoz.

Általában a megfelelő dózis és kezelési mód olyan mennyiségben biztosítja az aktív vegyülete(ke)t, ami terápiás és/vagy profilaktikus előnyökkel rendelkezik. Az ilyen választ úgy követhetjük, hogy figyeljük, a kezeletlen betegekkel összehasonlítva a kezelt betegekben kialakul-e egy jobb klinikai állapot (azaz a



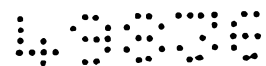
gyakoribb remisszió, teljes vagy részleges, vagy hosszabb betegségmentes túlélés). A HER-2/neu fehérje vagy fúziós fehérje ellen már kialakult immunválaszok növekedése általában korrelál egy jobb klinikai eredménnyel. Az ilyen immunválaszokat általában standard szaporodási, citotoxicitási vagy citokin esszékkel értékelhetjük ki, amiket egy betegből kezelés előtt és után vett minták felhasználásával hajthatunk végre.

A rák kimutatása

A. A rák kimutatásának módszerei

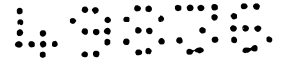
A rákot egy betegben általában azon az alapon lehet kimutatni, hogy a HER-2/neu fehérjék és/vagy az ilyen fehérjéket kódoló polinukleotidok jelen vannak-e egy betegből vett biológiai mintában (azaz vérben, szérumban, plazmában, vizeletben és/vagy tumor biopsziákban). Másszóval, az ilyen fehérjéket markerekként használhatjuk, hogy a rák, azaz például emlő-, petefészek-, vastagbél-, tüdő- vagy prosztatarák, stb. jelenlétét vagy hiányát kimutassuk. Az itt biztosított kötő ágensek általában lehetővé teszik olyan szintű HER-2/neu fehérje kimutatását, ami kötődik a biológiai mintában levő ágenshez. Polinukleotid primereket és próbákat használhatunk arra, hogy kimutassuk a HER-2/neu tumorfehérjét kódoló mRNS szintjét, ami szintén jelzi a rák jelenlétét vagy hiányát. A HER-2/neu tumor szekvenciájának általában olyan szinten kell jelen lennie, ami legalább háromszor magasabb a tumorszövetben mint a normális szövetben.

Számos különböző, a szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember számára ismert esszé formátum létezik egy kötő ágens felhasználásával, amivel egy mintában ki lehet



mutatni a polipeptid markereket [Harlow és mtsai: „Antibodies: A Laboratory Manual, 2. kiadás, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)]. Általánosságban a rák jelenléte vagy távolléte egy betegben a következő lépésekkel határozhatók meg: a) egy betegből vett biológiai mintát érintkezésbe hozunk egy kötő ágenssel; b) a mintában kimutatjuk a polipeptidnek azt a szintjét, ami kötődik a kötő ágenshez; és c) a polipeptid szintjét összehasonlítjuk egy előre meghatározott határértékkel.

Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint az esszében egy szilárd hordozóra rögzített kötő ágenszt használunk, hogy a mintából megkösse és eltávolítsa a polipeptidet. A megkötött polipeptidet azután egy kimutató regenssel kimutathatjuk, ami tartalmaz egy riporter csoportot, és specifikusan kötődik a kötő ágens/polipeptid komplexhez. Egy ilyen kimutató reagens tartalmazhat például egy olyan kötő ágenszt, ami specifikusan kötődik a polipeptidhez vagy egy ellenanyaghoz, vagy más ágenshez, ami specifikus kötődik a kötő ágenshez azaz például anti-immunglobulint, protein G-t, protein A-t vagy egy lektint. Egy másik változat szerint egy kompetitív esszé használható, amiben egy polipeptidet egy riporter csoporttal jelölünk, és hagyjuk, hogy kötődjön az immobilizált kötő ágenshez, a kötő ágensnek a mintával való inkubálása után. Annak mértéke, hogy a minta komponensei mennyire gátolják a jelzett polipeptidnek a kötő ágenshez való kötődését, jelzi a mintának az immobilizált kötő ágenssel való reakcióképességét. Az ilyen esszéekben használható megfelelő polipeptidek közé tartoznak a teljes hosszúságú HER-2/neu tumorfehérjék valamint azok azon részei, amikhez a kötő ágens kötődik, és a HER-2/neu fúziós fehérjék és azok azon



részei, amikhez a kötő ágens kötődik, az előzőkben ismertetett módon.

A szilárd hordozó lehet bármilyen, a szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember számára ismert anyag, amihez a tumorfehérje hozzákapcsolható. A szilárd hordozó lehet például egy teszt luk egy mikrotiter lemezben, vagy egy nitrocellulóz vagy más megfelelő membrán. Egy másik változat szerint a hordozó lehet gyöngy vagy korong, azaz például üveg, üvegszál, latex vagy műanyag azaz például polisztirol vagy polivinilklorid. A hordozó lehet mágneses részecske vagy száloptikás érzékelő, amiket például az 5,359,681 számú Amerikai Egyesült Államokbeli szabadalmi leírásban ismertettek. A kötő ágenszt a szakterületen jártas szakember számára ismert számos különböző technikával immobilizálhatjuk a szilárd hordozóhoz, amely technikákat bőven ismertetnek a szabadalmi és tudományos irodalomban. A jelen találmány szövegösszefüggésében az "immobilizálás" szakkifejezés jelenthet mind nem-kovalens asszociációt, azaz adszorpciót, mind kovalens kapcsolódást (ami lehet egy közvetlen kapcsolódás az ágens és a hordozón levő funkciós csoportok között, vagy lehet egy keresztkötő ágenssel létrehozott kapcsolat). A mikrotiter lemez lukához vagy egy membránhoz való adszorpcióval létrejött immobilizálást részesítjük előnyben. Ezekben az esetekben az adszorpciót úgy érhetjük el, hogy a kötő ágenszt egy megfelelő pufferben elég hosszú ideig érintkezésbe hozzuk a szilárd hordozóval. Az érintkezési idő változik a hőmérséklettel, de tipikus esetben 1 óra és 1 nap között lehet. Általánosságban, egy műanyag (azaz polisztirol vagy polivinilklorid) mikrotiter lemez egy lukát körülbelül 10 ng és 10 µg közötti mennyiségű, előnyösen körülbelül 100 ng - 1 µg mennyiségű kötő



ágenssel hozzuk érintkezésbe, és ez elegendő ahhoz, hogy a kötő ágensből megfelelő mennyiséget immobilizáljunk.

A kötő ágensnek egy szilárd hordozóhoz való kovalens kapcsolását általában úgy hajthatjuk végre, hogy először a hordozót reagáltatjuk egy bifunkciós reagenssel, ami mind a hordozóval, mind a kötő ágensen levő funkciós csoporttal, azaz például egy hidroxici-csoporttal vagy aminocsoporttal reagál. A kötő ágens például kovalens kötéssel kapcsolódhat a megfelelő borítással rendelkező hordozókhoz, benzokinont használva, vagy a hordozón levő aldehid csoportot kondenzáltatva a kötő partneren levő aminnal vagy aktív hidrogénnel [lásd például Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, A12-A13 (1991)].

Néhány megvalósítási mód szerint az esszé egy két ellenanyag szendvics esszé. Ezt az esszét úgy hajthatjuk végre, hogy először a szilárd hordozóra, általában egy mikrotiter lemez lukába immobilizált ellenanyagot hozzuk érintkezésbe a mintával, oly módon, hogy a mintában levő polipeptideket hagyjuk az immobilizált ellenanyaghoz kötődni. A megkötetlen mintát azután eltávolítjuk az immobilizált polipeptid-ellenanyag komplexekről, és hozzáadunk egy riporter csoportot tartalmazó kimutatási reagenst (előnyösen egy második ellenanyagot, ami a polipeptiden egy másik helyet képes kimutatni). Ezután meghatározzuk a szilárd hordozóhoz kötve maradt kimutató reagens mennyiségét, az éppen használt riporter csoporthoz megfelelő módszert használva.

Még pontosabban, ha az ellenanyagot már az előzőekben ismertett módon immobilizáltuk a hordozóra, a hordozón megmaradt fehérjekötő helyeket tipikus esetben blokkoljuk. A szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember számára



ismert bármilyen, megfelelő blokkoló ágens használható, azaz például a szarvasmarha szérum-albumin vagy a Tween 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Az immobilizált ellenanyagot azután a mintával inkubáljuk, és hagyjuk, hogy a polipeptid kötődjön az ellenanyaghoz. A mintát egy megfelelő hígítószerrel, azaz például foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS) hígíthatjuk az inkubálás előtt. Általánosságban a megfelelő érintkezési idő (azaz inkubációs periódus) az az időtartam, ami elég a polipeptid jelenlétének kimutatására egy emlő-, petefészek-, vastagbél-, tüdő- vagy prosztatatarákbanszenvedő betegből vett mintában. Az érintkezési idő előnyösen elegendő olyan kötési szint elérésére, ami legalább 95%-a a megkötött és meg nem kötött polipeptid közötti egyensúlynak. A szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember számára nyilvánvaló, hogy az egyensúly eléréséhez szükséges idő könnyen meghatározható, ha vizsgáljuk az adott időtartam alatt fellépő kötődés szintjét. Szobahőmérsékleten általában 30 perces inkubálási idő elegendő.

A megkötetlen mintát azután eltávolítjuk, oly módon, hogy a szilárd hordozót megfelelő pufferrel, azaz például 0,1% Tween 20™-et tartalmazó foszfáttal pufferelt sóoldattal mossuk. A második ellenanyagot, ami a riporter csoportot tartalmazza, azután hozzáadhatjuk a szilárd hordozóhoz. Az előnyben részesített riporter csoportok közé tartoznak az előzőekben említett csoportok.

A kimutató reagenst azután annyi ideig inkubáljuk az immobilizált ellenanyag-polipeptid komplexszel, ami elég a megkötött polipeptid kimutatásához. A megfelelő hosszúságú időtartamot általában úgy határozzuk meg, hogy vizsgáljuk egy adott időtartam alatt létrejövő kötődés szintjét. A megkötetlen reagenst azután eltávolítjuk, és a megkötött kimutató reagenst a riporter



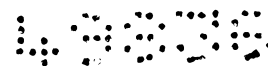
csoporttal mutatjuk ki. A riporter csoport kimutatására használt módszer függ a riporter csoport természetétől. A radioaktív csoportok esetében a szcintillációs számlálás vagy az autoradiográfia módszerek általában elfogadhatók. A festékeket, lumineszcens csoportokat és fluoreszcens csoportokat spektroszkópiás módszerekkel mutathatjuk ki. Az avidin kimutatására biotint használhatunk, egy eltérő riporter csoporthoz (általában egy radioaktív vagy fluoreszcens csoporthoz vagy enzimhez) kapcsolva. Az enzim riporter csoportokat általában a szubsztrát hozzáadásával (általában specifikus időtartamra) mutatjuk ki, amit a reakciótermékek spektroszkópiás vagy más elemzése követ.

Egy rák, azaz például emlő-, petefészek-, vastagbél-, tüdő- vagy prosztaták jelenlétének meghatározására a szilárd hordozóhoz kötve maradt riporter csoportból kimutatott jelet általában egy olyan jellel hasonlítjuk össze, ami model egy előre meghatározott határértéknek. Egy előnyben részesített megvalósítási módszerint a rák kimutatásának határértéke az az átlagos jel, amit akkor kapunk, ha az immobilizált ellenanyagot a rákban nem szenvedő betegekből nyert mintákkal inkubáljuk. Általában azt a mintát tekintjük a rák szempontjából pozitívnak, ami az előre meghatározott határértéknél három standard deviációval magasabb jelet generál. Egy másik, előnyben részesített megvalósítási mód szerint a határértéket Sackett és munkatársai módszerével, egy Receiver Operator Curve használatával határozzuk meg [Sackett és mtsai: *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, 106-107. oldal, Little Brown and Co., (1985)]. Röviden, ebben a megvalósítási módban a határértéket a diagnosztikai teszteredmények minden egyes határértékének megfelelő, az igaz pozitívak (azaz az érzékenység) és hamis pozitívak



(100%-os specificitás) ábrázolásából határozhatjuk meg. A görbén az a legpontosabb határérték, ami a legközelebb van a bal felső sarokhoz (azaz az az érték, ami a legnagyobb területet zárja le), és azt a mintát tekintjük pozitívnak, ami olyan szignált generál, ami magasabb, mint az ezzel a módszerrel meghatározott határérték. Egy másik változat szerint a határértéket a görbén balra tolhatjuk, hogy minimalizáljuk a hamis pozitív eredményeket, vagy jobbra tolhatjuk, hogy minimalizáljuk a hamis negatív értékeket. Általánosságban azt a mintát tekintjük a rák szempontjából pozitívnak, ami olyan mintát generál, ami magasabb, mint az ezzel a módszerrel meghatározott határérték.

Egy rokon megvalósítási mód szerint az esszét átfolyó, vagy tesztcsík formátumban is elvégezhetjük, amiben a kötő ágens egy membránra, azaz például nitrocellulózra van immobilizálva. Az átfolyó tesztben a mintában levő polipeptidek kötődnek az immobilizált kötő ágenshez, ahogy a minta átfolyik a membrán. Egy második, jelzett kötő ágens azután kötődik a kötő ágens - polipeptid komplexhez, ahogy a második kötő ágens tartalmazó oldat átfolyik a membránon. A megkötött második kötő ágens ki-mutatását azután az előzőekben ismertetett módon hajthatjuk végre. A tesztcsík formátumban a membrán egyik végét, amihez a kötő ágens rögzítettük, a mintát tartalmazó oldatba merítjük. A minta a membránon egy olyan régió keresztül vándorol, ami tartalmazza a második kötő ágens, majd az immobilizált kötő ágens területére vándorol. Az immobilizált ellenanyag területén a második kötő ágens töményedése jelzi a rák jelenlétét. Tipikus esetben a második kötő ágens töményedése az adott pontban egy mintázatot, azaz egy vonalat generál, ami vizuálisan leolvasható. Egy ilyen mintázatnak a hiánya negatív eredményt jelent. Általá-



nosságban, a membránra immobilizált kötő ágens mennyiségét úgy választjuk ki, hogy vizuálisan megfigyelhető mintázatot generáljunk, ha a biológiai minta olyan mennyiségben tartalmazza a polipeptidet, ami elég ahhoz, hogy pozitív jelet generáljon a két-ellenanyag szendvics esszében, az előzőkben tárgyalt formában. Az ilyen esszéekben való felhasználáshoz előnyben részesített kötő ágensek ellenanyagok és azok antigén-kötő fragmentumai. A membránra immobilizált ellenanyag mennyisége előnyösen körülbelül 25 ng és körülbelül 1 µg között lehet, még előnyösebben kontroll 50 ng és körülbelül 500 ng között lehet. Az ilyen tesztek tipikus esetben nagyon kis mennyiségű biológiai mintával is végrehajthatjuk.

Természetesen nagyon sok más esszé protokoll létezik, amik alkalmasak a jelen találmány szerinti tumorfehérjékkel vagy kötő ágensekkel. A szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember számára például nyilvánvaló, hogy a fenti protokollok könnyen módosíthatók úgy, hogy a HER-2/neu polipeptideket használjuk azoknak az ellenanyagoknak a kimutatására, amik kötődnek az ilyen polipeptidekhez egy biológiai mintában. Az ilyen HER-2/neu fehérjére specifikus ellenanyagok kimutatása korrelálhat a rák jelenlétével.

Egy rákbetegséget például egy másik változat szerint olyan T-sejtek jelenléte alapján lehet kimutatni, amik specifikusan reagálnak egy HER-2/neu fúziós fehérjével egy biológiai mintában. Néhány módszer szerint egy betegből izolált, CD4⁺ és/vagy CD8⁺ T-sejteket tartalmazó biológiai mintát HER-2/neu fúziós fehérjével, egy fúziós fehérjét kódoló polinukleotiddal és/vagy legalább egy ilyen fúziós fehérjét expresszáló APC-vel inkubáljuk, majd kimutatjuk a T-sejtek specifikus aktiválását. A T-sejtek pél-

dául rutin technikákkal (azaz például perifériális vér limfociták Ficoll/Hypaque sűrűség-gradiens centrifugálásával) izolálhatók egy betegből. A T-sejteket *in vitro* 2-9 napig (tipikus esetben 4 napig) 37 °C-on inkubáljuk HER-2/neu fúziós fehérjével (azaz például 5-25 µg/ml fehérjével). Az kívánatos lenne, hogy a T-sejt minta más alikvot részét HER-2/neu fúziós polipeptid nélkül inkubáljuk, hogy kontrollként szolgáljon. A CD4⁺ T-sejtek esetében az aktiválást előnyösen a T-sejtek szaporodásának kiértékelése alapján mutatjuk ki. A CD8⁺ T-sejtek esetében az aktiválást előnyösen a citolitikus aktivitás kiértékelésével mutatjuk ki. A szaporodás szintje, ami legalább kétszer nagyobb, és/vagy a citolitikus aktivitás, ami legalább 20%-kal nagyobb mint a betegség-mentes betegekben, jelzi a rák jelenlétét a betegben.

Amint az előzőekben megjegyeztük, egy rákot kimutathatunk még, vagy egy alternatív módszer szerint, a biológiai mintában levő HER-2/neu fehérjét kódoló mRNS szintje alapján. Például legalább két oligonukleotid primer használható egy polimeráz láncreakció (PCR) alapú esszében, amivel amplifikálhatjuk a biológiai mintából származó HER-2/neu cDNS egy részét, aholis az oligonukleotid primerek közül legalább az egyik a HER-2/neu fehérjére specifikus (azaz hibridizálódik hozzá). Az amplifikált cDNS-t azután elválasztjuk és a szakterületen jól ismert technikával, azaz például gélelektroforézissel kimutatjuk. Hasonlóképpen, a HER-2/neu fehérjét vagy fúziós fehérjét kódoló polinukleotidhoz specifikusan hibridizálódó oligonukleotid próbák használhatók egy hibridizációs esszében, hogy kimutassuk a HER-2/neu fehérjét kódoló polinukleotid jelenlétét egy biológiai mintában.



Ahhoz, hogy lehetővé tegyük a hibridizációt az esszé körülményei között, az oligonukleotid primereknek és próbáknak tartalmazniuk kell egy oligonukleotid szekvenciát, ami legalább körülbelül 60%-ban, előnyösen körülbelül 75%-ban, és még előnyösebben legalább körülbelül 90%-ban azonos egy HER-2/neu fehérjét vagy fúziós fehérjét kódoló polinukleotid egy részével, amely próba legalább 10 nukleotid, előnyösen legalább 20 nukleotid hosszúságú. Előnyösen, az oligonukleotid primerek és/vagy próbák egy itt ismertetett HER-2/neu fehérjét vagy fúziós fehérjét kódoló polinukleotidhoz hibridizálódnak az előzőkben definiált közepesen szigorú körülmények között. Az itt ismertetett diagnosztikai módszerekben használt oligonukleotid primerek és/vagy próbák előnyösen legalább 10-40 nukleotid hosszúságúak. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint az oligonukleotid primerek 10 egybefüggő nukleotidot, előnyösebben legalább 15 egybefüggő nukleotidot tartalmaznak egy DNS molekulából, aminek a szekvenciáját a 6. és 7. számú szekvenciavázlaton mutatjuk be. A polimeráz láncreakció alapú és hibridizációs esszék technikai jól ismertek a szakterületen [Mullis és mtsai: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51, 263 (1987); Erlich (szerk.): PCR Technology, Stockton Press, New York (1989)].

Egy előnyben részesített esszé reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakciót alkalmaz, amiben a polimeráz láncreakciót a reverz transzkripcióval kapcsolatban használjuk. Tipikus esetben az RNS-t egy biológiai mintából, azaz például egy biopszia szövetből extraháljuk, és reverz transzkripcióval cDNS molekulákat készítünk belőle. A legalább egy specifikus primert használó polimeráz láncreakciós amplifikálás egy cDNS molekulát generál, ami például gélelektroforézissel elválasztható és láthatóvá



tehető. Az amplifikálást egy vizsgált betegből és egy másik, rákban nem szenvedő emberből vett biológiai mintákon hajtjuk végre. Az amplifikálási reakciót a cDNS több hígításával hajthatjuk végre, ami két nagyságrendre is kiterjedhet. A vizsgált beteg mintájának több hígításával kapott expressziót a nem-rákos mintával kapott minta azonos hígításából kapott expresszióval összehasonlítva egy kétszeres vagy nagyobb növekedést tipikus esetben pozitívnak tekintünk.

Egy másik megvalósítási mód szerint a HER-2/neu fehérjék vagy fúziós fehérjék és az ilyen fehérjéket vagy fúziós fehérjéket kódoló polinukleotidok használhatók markerként a rák előrehaladásának követésére. Ebben a megvalósítási módban az előzőekben a rák diagnosztizálására használt módszereket időben többször végrehajthatjuk, és a reaktív polipeptid(ek) szintjének változását kiértékeljük. Az esszéket például 6 hónapig, vagy 1 évig minden 24-72 órában végrehajthatjuk, és azután szükség szerint hajtjuk végre. A rák általában azokban a betegekben fejlődik tovább, akikben a kötési ágenssel kimutatott polipeptid szintje időben növekszik. Ezzel ellentétben, a rák nem fejlődik tovább, ha a reakcióképes polipeptid szintje vagy állandó marad, vagy időben nő.

Néhány *in vivo* diagnosztikai esszé végrehajtható közvetlenül a tumoron. Egy ilyen esszében a tumorsejteket egy kötő ágenssel hozzuk érintkezésbe. A megkötött kötő ágenszt azután közvetlenül vagy közvetve, egy riporter csoporton keresztül mutathatjuk ki. Az ilyen kötő ágenszt használhatjuk a hisztológiai alkalmazásokban. Egy másik változat szerint az ilyen alkalmazásokban polinukleotid próbák használhatók.



Amint az előzőkben jeleztük, az érzékenység fokozására egy adott mintában több HER-2/neu fúziós fehérje marker vizsgálható. Az nyilvánvaló, hogy az itt megadott különböző fehérjékre specifikus kötő ágensek egyetlen esszében kombinálhatjuk. Emellett ezzel egyidőben több primer vagy próba használható. A tumorfehérje markerek szelekciója rutin kísérleteken alapulhat, hogy meghatározzuk azokat a kombinációkat, amik optimális érzékenységet biztosítanak. Emellett, vagy egy másik változat szerint, az itt biztosított tumorfehérjék vizsgálatát kombinálhatjuk más ismert tumor antigének vizsgálatával.

B. Diagnosztikai kettek

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá az olyan kettek, amiket az előző diagnosztikai módszerek bármelyikében lehet használni. Egy ilyen kit tipikus esetben két vagy több, a diagnosztikai vizsgálatok végrehajtásához szükséges komponenst tartalmaz. A komponensek lehetnek vegyületek reagensek, konténerek és/vagy berendezések. Például egy kitben levő konténer tartalmazhat egy monoklonális ellenanyagot vagy annak fragmensét, ami specifikusan kötődik a HER-2/neu fúziós fehérjéhez. Az ilyen ellenanyagokat vagy fragmenseiket egy hordozó anyaghoz kötve állíthatjuk elő, az előzőkben ismertetett módon. Egy vagy több további konténer az esszében használt elemeket, azaz reagenseket vagy puffereket tartalmazhat. Az ilyen kettek emellett, vagy alternatíve, tartalmazhatnak egy előzőkben ismertetett kimutató reagenst, ami olyan riporter csoportot tartalmaz, ami megfelel az ellenanyag kötődésének közvetlen vagy közvetett kimutatásához.



Egy másik változat szerint kit tervezhető, amivel egy biológiai mintában levő HER-2/neu fehérjét kódoló mRNS szintjét lehet kimutatni. Az ilyen kittek általában legalább egy, az előzőkben ismertetett oligonukleotid próbát vagy primert tartalmaznak, ami hibridizálódik egy HER-2/neu fehérjét vagy fúziós fehérjét kódoló polinukleotidhoz. Egy ilyen oligonukleotid például egy polimeráz láncreakcióban vagy hibridizációs esszében használható. Az ilyen kittekben még előforduló további komponens lehet még egy második oligonukleotid és/vagy egy diagnosztikai reagens vagy konténer, ami megkönnyíti a HER-2/neu fehérjét kódoló polinukleotid kimutatását.

Az ebben a leírásban idézett összes publikációt és szabadalmi bejelentést referenciának tekintjük, ugyanúgy, mintha minden egyes publikáció vagy szabadalmi bejelentés esetében külön megjegyeztük volna, hogy referenciának tekintjük

Bár ezt a találmányt bizonyos részletességgel írtuk le, az illusztrációkat és példákat használva a megértés egyszerűsítése céljából, a szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember számára nyilvánvaló a jelen találmány kitanítása alapján, hogy bizonyos változtatások és módosítások tehetők benne, anélkül hogy eltérnének a csatolt igénypontok szellemétől vagy oltalmi körétől.

Példák

Az alábbi példákat illusztrálás céljából adjuk meg, és nem szándékunk, hogy ezekkel korlátozzuk a jelen találmány vagy a csatolt igénypontok oltalmi körét.

A példákban az általános molekuláris biológiai reagenseket, azaz például oligonukleotid primereket, a lipofectamine-t és a



restriktív endonukleázokat főleg a Gibco/BRL-től (Grand Island, NY) szereztük be. Az AatII és PflM restriktív endonukleázokat a New England Biolabs-tól (Beverly, MA) szereztük be. A HER-2/neu ELISA esszé kittet és az Ab-3 HER-2/neu specifikus monoklonális ellenanyagot az Oncogene Science-től (Manhasset, NY) vásároltuk. A pFLAGCMV-1 expressziós vektort és a FLAG-Tag M2 ellenanyagot a Kodak-tól (Rochester, NY) vásároltuk. A Pfu polimerázt a Stratagene-től (LaJolla, CA) vásároltuk. A pcDNA3.1/hyg expressziós vektort az Invitrogen-től (Carlsbad, CA) vásároltuk.

1. Példa

A HER-2/neu ICD, KD és PD fragmenseinek klónozása a pFLAGCMV-1 expressziós vektorba

A HER-2/neu-nak azokat a DNS fragmenseit, amik az intracelluláris domént (ICD), a kináz domént (KD) és a foszforilációs domént (PD) kódolják, külön-külön állítjuk elő polimeráz láncreakcióval. A HindIII és XhoI restriktív enzimekkel végzett emésztésekhez szükséges hasítási helyeket vittünk be ezek 5' és 3' végére. Az a terv lehetővé tette a DNS fragmensek klónozását a pFLAGCMV-1 expressziós vektorba (Kodak) egy preprotripszin vezérszekvenciával és egy FLAG Tag szekvenciával az N-terminálisán. A polimeráz láncreakció termékeket tisztítjuk, majd a pFLAGCMV-1 HindIII és SalI hasítási helyére klónozzuk. A kapott expressziós plazmidok jelölése pFLAGCMV-1/ICD (1. ábra), pFLAGCMV-1/KD (2. ábra) és a pFLAGCMV-1 (3. ábra).

2. Példa



Az ECD-PD fúziós fehérje klónozása a pcDNA3.1/hyg expressziós vektorba

A HER-2/neu PD-t kódoló DNS fragmenst polimeráz láncreakcióval amplifikáljuk. A gélen való tisztítás után a pT7-HER-2/neu plazmid AatII és XhoI hasítási helyeire klónozzuk. Ezzel az eljárással egy új klónozó vektort generáltunk, a pT7/ECD-PD-t, ami összekapcsolja az ECD-t és a PD-t (beleértve a transzmembrán domén Ser csoportját is). A pT7/ECD-PD plazmidot 1 óra hosszat 37 °C-on HindIII és XhoI restriktív enzimekkel emésztjük. Az ECD-PD fúziós fehérjét kódoló 2,7 kilobázis méretű DNS fragmenst gélen tisztítjuk, majd a pcDNA3.1/hyg plazmid (Invitrogen) HindIII és XhoI hasítási helyeire klónozzuk. A kapott expressziós vektor jele pcDNA3.1/hyg/ECD-PD (5. ábra).

3. Példa

A HER-2/neu ICD, KD és PD fragmenseinek expressziója HEK-293 sejtekben

A pFLAGCMV-1 expressziós plazmidot (Kodak) használjuk annak meghatározására, hogy a HER-2/neu intracelluláris doménjének melyik régióját lehet a tenyészközegbe szekretálni. A fehérjéket a preprotripszin szekréción szignállal és egy FLAG-Taggal az N-terminálison képzett fúziók formájában expresszáljuk, az 1. példában leírt módon.

Az ICD-t, KD-t és PD-t expresszáló sejtvonalak transzfekcióját az alábbiak szerint hajtjuk végre: humán embrionális vese sejtvonalakat (HEK-293 sejtek) szaporítunk Dulbecco féle Eagle Minimális Esszenciális Táptalajban, ami 10% borjúmagzat szérumot tartalmaz. A transzfekció előtt egy nappal $1,5 \times 10^5$ sejtet oltunk egy hatlukas lemez egyes lukáiba. A transzfekciót 1 μ g



plazmid DNS-sel hajtjuk végre, lipfectamine-nal (Gibco BRL), szérummentes közegben. A tenyésztő közeget és a sejteket 72 órával később begyűjtjük. A stabil transzformánsok szelektálásához a transzfektált sejteket 200 µg/ml higromicint tartalmazó táptalajon tenyésztjük.

A sejteket és a táptalajokat Western blottal átvizsgáljuk, hogy van-e bennük fúziós fehérje, az alábbiak szerint: a transzfektált HEK-293 sejtekből származó táptalajokat és sejtizátumokat 7,5%-os SDS poliakrilamid gélen választjuk szét. A fehérjéket elektroforetikusan átvisszük polivinilidén-difluorid (PVDF) szűrőlapokra. A PVDF szűrőlapokat először TBST-ben (20 mmol/l TRISZ pH=7,5, 150 mmol/l nátrium-klorid, 0,01% Tween 20) készített 5% szarvasmarha szérum-albuminnal inkubáljuk, majd 1 óra hosszat a primer ellenanyaggal inkubáljuk, végül pedig egy újabb óra hosszat peroxidázzal konjugált kecske anti-egér ellenanyaggal. Az immunblottokat az ECL rendszerrel (Amersham Corp.) hívjuk elő. Az egér monoklonális ellenanyagot, a c-neu Ab-3-at ("Ab-3") (Oncogene Science) használjuk a HER-2/neu fehérje kimutatására. Az Ab-3 felismeri a humán HER-2/neu fehérje C-terminálisát. A FLAG-Tag fúziós fehérjék kimutatására az M2 monoklonális ellenanyagok (Kodak) használjuk az elemzésben a primer ellenanyag kimutatására.

A 4. ábrán bemutatott eredmények azt mutatják, hogy sem a teljes hosszúságú ICD, sem a KD nem szekretálódott, de a PD kimutatható volt a tenyésztet táptalajában. Az eredmények azt mutatják, hogy a KD struktúrája nem engedi meg a fehérje átvitását a sejtmembránon keresztül.

4. Példa



Az ECD-PD fúziós fehérjék expressziója a HEK-293 és CHO sejtekben, a pcDNA3.1/hyg expressziós vektor használatával

Az ECD-PD fúziós fehérjét egy preprotripszin szekréción szignállal és az N-terminálisán egy FLAG-Tag-gal jelezve állítjuk elő, a 2. példában ismertetett módon.

Az ECD-PD-t expresszáló sejtvonalak transzfekcióját és szaporítását az alábbiak szerint végezzük: a HEK-293 és aranyhörcsög petefészek (CHO) sejteket 10% borjúmagzat szérumot tartalmazó Dulbecco féle Eagle Minimális Esszenciális Táptalajban szaporítjuk. Egy nappal a transzfekció előtt $1,5 \times 10^5$ sejtet oltunk egy hatlukas lemez mindegyik lukába. A transzfekciót 1 μg plazmid DNS-sel hajtjuk végre, lipfectamine-nal (Gibco BRL), szérumentes közegben. A tenyésztő közeget és a sejteket 72 órával később begyűjtjük. A stabil transzformánsok szelektálásához a transzfektált sejteket 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ higromicint tartalmazó táptalajon tenyésztjük.

Az oldható ECD-PD fúziós fehérje szekréciónját ELISA esszével határozzuk meg, HER-2/neu ECD specifikus ellenanyagokat használva, az alábbiak szerint: a mikrotiter lemezt előr beborítjuk HER-2/neu specifikus egér ellenanyaggal (Oncogene Science), hogy befogjuk a mintában levő HER-2/neu fehérjét. A tesztmintákat mikrotiter lemezben inkubáljuk éjszakán át, szobahőmérsékleten, majd 1 óra hosszat kimutató ellenanyaggal inkubáljuk, végül egy újabb óra hosszat tormaperoxidázzal konjugált kecske anti-nyúl ellenanyaggal inkubáljuk. Az o-feniléndiamin peroxidáz szubsztrát hozzáadása után színezett termék keletkezik. A színes terméket spektrofotometriásan határozzuk meg. A 490 nm-en mérhető elnyelés tükrözi a mintákban levő neu fehérje mennyiségét.



Ezután az oldható ECD-PD fúziós fehérje szekrécióját határozzuk meg Western blot elemzéssel, HER-2/neu PD specifikus ellenanyagok használatával, az alábbiak szerint: a transzfektált HEK-293 sejtekből származó tenyészet táptalajt és sejtlyázatumot 7,5%-os SDS poliakrilamid gélen választjuk szét. A Western blot elemzéshez a fehérjéket elektroforetikusán átvisszük polivinilidén-difluorid (PVDF) szűrőlapokra. A PVDF szűrőlapokat először TBST-ben (20 mmol/l TRISZ pH=7,5, 150 mmol/l nátrium-klorid, 0,01% Tween 20) készített 5% szarvasmarha szérum-albuminnal inkubáljuk, majd 1 óra hosszat a primer ellenanyaggal inkubáljuk, végül pedig egy újabb óra hosszat peroxidázzal konjugált kecske anti-egér ellenanyaggal. Az immunblottokat az ECL rendszerrel (Amersham Corp.) hívjuk elő. Az egér monoklonális ellenanyagot, a c-neu Ab-3-at ("Ab-3") (Oncogene Science) használjuk a HER-2/neu fehérje kimutatására. Az Ab-3 felismeri a humán HER-2/neu fehérje C-terminálisát. A FLAG-Tag fúziós fehérjék kimutatására az M2 monoklonális ellenanyagot (Kodak) használjuk az elemzésben primer ellenanyagként. Az eredményeket a 6. ábrán mutatjuk be.

5. Példa

A humán ECD- Δ PD fúziós fehérje klónozása a pcDNA3.1/hyg expressziós vektorba

A humán ECD- Δ PD fúziós fehérjét (lásd a 13. ábrát, 7. számú szekvencia) polimeráz láncreakcióval állítjuk elő, az alábbi primerek használatával:

PDM-251 5'-cctgaatcgcaacccaagtgtgcaccggcac-3'

(15. számú szekvencia) Tm 69 °C

PDM-279 5'-ctggactcgagtcattagcgggtgcctgtggtgg-3'



(16. számú szekvencia) Tm 69 °C.

A polimeráz láncreakció körülményei a következők: 10 µl 10× Pfu puffer (Stratagene), 1 µl 10 mmol/l dNTP, 2 µl 10 µmol/l mindegyik oligomerből, 83 µl steril víz, 1,5 µl Pfu DNS polimeráz és 50 ng templát, 96 °C 2 percig × 1 ciklus; (96 °C 20 másodperc, 69 °C 15 másodperc, 72 °C 5 perc) × 40 ciklus; 72 °C 5 perc × 1 ciklus. A polimeráz láncreakció termékét NruI és XhoI restriktációs enzimekkel emésztjük, majd a pPDM His vektorba klónozzuk (módosított pET28 vektor, aminek van egy His tag-in-frame része egy tompavégű (Eco 72I) restriktációs enzim hasítási hellyel), amit Eco 72I és XhoI restriktációs enzimekkel emésztünk. A szekvenciát igazoljuk, majd a rekombináns plazmidot BL21 pLys S-be transzformáljuk az *Escherichia coli*-ban való expresszióhoz. A plazmid konstrukciót azután BamHI és XhoI restriktációs enzimekkel emésztjük, majd pcDNA3.1/hyg/ECD-PD vektorba klónozzuk, amit ugyanazokkal a restriktációs enzimekkel emésztjük.

6. Példa

A humán ECD-PD-C_r-HIS tag fúziós fehérje expressziója *Escherichia coli*-ban

A humán ECD-PD fúziós fehérjét a pcDNA3.1/hyg vektorba klónozzuk, a 2. példában ismertetett módon, majd templátként használjuk olyan hECD-PD konstruálásához, ami leolvasási keretben tartalmaz egy 6 hisztidinből álló C-terminális jelölést. A hECD-PD-t polimeráz láncreakcióval amplifikáljuk, az alábbi primerek alkalmazásával:

AWO28 hECD-PD értelmes primer, NcoI hasítási hellyel:

5'-GGGccatggggAGCACCCAAGTGTGCACCGGC-3'

(17. számú szekvencia)



AW029 hECD-PD antiszensz primer, XhoI hasítási hely stop nélkül:

5'-GGGctcgagCACTGGCACGTCCAGACCCAGG-3'

(18. számú szekvencia)

A polimeráz láncreakció termékét azután NcoI és XhoI restriktációs enzimekkel hasítjuk, majd a pET28b expressziós vektorba ligáljuk, amit ugyanezzel a két restriktációs enzimmel linearizáltunk. A ligálás termékét NovaBlue sejtekbe transzformáljuk, majd a szűrővizsgálathoz több telepet szelektálunk. Ezek közül a hECD-PD.C_rhis klónokat DNS szekvenálással ellenőrizzük, majd a következő fehérje expresszázásban használjuk.

A fehérje expresszázásához a hECD-PD.C_rhis klónt kompetens BL21 (DE3) CodonPlus-RIU *Escherichia coli* sejtekbe transzformáljuk. Standard mini-expressziós szűrővizsgálatot végzünk a transzformálásból származó klónokkal, hogy meghatározzuk az indukció hozamát. A legjobb eredményeket akkor kaptuk, amikor a sejteket 2 óra hosszat 37 °C-on TB táptalajban szaporítjuk.

Az *Escherichia coli* által termelt hECD-PD.C_rhis-t azután monoQ oszlopon tisztítjuk, majd a térszerkezetét újra kialakítjuk 20 mmol/l TRIS-HCl (pH=8,0) pufferben. A térszerkezetét újra felvett fehérjét levizsgáltuk, és Western blottal valamint ELISA-val vizsgálva pozitívnak bizonyultak Herceptin kötődés szempontjából (17. ábra). A Herceptint kötő aktivitás azonban később elveszett, valószínűleg a fehérje denaturálódása miatt.

7. Példa

A humán N_r-His Tag-ECD-PD fúziós fehérje expressziója *Escherichia coli*-ban



A humán ECD-PD fúziós fehérjét a pPDM expressziós vektorba klónozzuk, az 5' NdeI és a 3' XhoI restriktív hasítási helyek felhasználásával. Az ECD-PD inszertet leolvasási keretben fuzionáltatjuk az N-terminális 6x hisztidin jelöléssel.

A fehérje expresszáálásához az N_r-His Tag-ECD-PD fúziós fehérjét tartalmazó pPDM vektort kompetens BL21 (DE3) CodonPlus-RIU *Escherichia coli* sejtekbe transzformáljuk. Standard mini-expressziós szűrővizsgálatot végzünk a transzformálásból származó klónokkal, hogy meghatározzuk az indukció hozamát. A legjobb eredményeket akkor kaptuk, amikor a sejteket 2 óra hosszat 37 °C-on TB táptalajban szaporítjuk.

Az *Escherichia coli* eredetű, tisztítatlan N_r-His Tag-ECD-PD fúziós fehérjét felismeri az egér c-neu-3 ellenanyag és egy nyúl anti-ECD ellenanyag. A tisztítás után az *Escherichia coli* eredetű N_r-His Tag-ECD-PD-t a Herceptin felismeri, mind Western blotban, mind ELISA esszében (17. ábra).

8. Példa

Az egér ECD-PD-C_r-HIS tag fúziós fehérje expressziója *Escherichia coli*-ban

Az egér ECD-PD fúziós fehérjét a pcDNA3.1/hyg vektorba klónozzuk, a 2. példában a humán ECD-PD fúziós fehérje klónozására ismertetett módon. Azután ezt a konstrukciót használjuk majd templátként olyan mECD-PD konstruálására, ami leolvasási keretben tartalmaz egy C-terminális 6x hisztidin jelölést, utána pedig egy stopkodont. Az mECD-PD/pcDNA3.1 konstrukcióban levő belső NcoI hasítási helyet (a nyitott leolvasási keret 1832-es bázispárja) helyspecifikus mutagenezissel megszüntetjük, az alábbi primerek használatával:



AW038 primer:

5'-GGCCCCTCCAGCCCCGATGGACAGCACCTTCTACCG-3'

(19. számú szekvencia)

AW039 primer:

5'-CGGTAGAAGGTGCTGTCCATCGGGCTGGAGGGGCC-3'

(20. számú szekvencia).

Miután a szekvenciát igazoltuk, az mECD-PD fúziós konstrukciót polimeráz láncreakcióval amplifikáljuk, az alábbi primerek felhasználásával

AW036 értelmes primer, NcoI restriktós hasítási hellyel:

5'-GGGccatggGTACCCAAGTGTGTACCGG-3'

(21. számú szekvencia)

AW037 antiszensz primer, XhoI restriktós hasítási hellyel:

5'-GGGctcgagTCAATGGTGATGGTGATGGTGTCATGGCACATCCAGGCCTAGGTA

(22. számú szekvencia).

A polimeráz láncreakció termékét azután NcoI és XhoI restriktós enzimekkel emésztjük, tisztítjuk, majd ugyanezzel a két restriktós enzimmel linearizált pET28b expressziós vektorba ligáljuk.

A ligálás termékét NovaBlue-ba transzformáljuk, ez több telepet eredményezett. A szekvencia-elemzéshez négy telepet választottunk ki. Ezek közül egy mECD-PD-C_r.his klónt, aminek pontos a szekvenciája, kompetens BL21 (DE3) CodonPlus-RIU *Escherichia coli* sejtekbe transzformáljuk. Standard mini-expressziós szűrővizsgálatot végzünk a transzformálásból származó klónokkal, hogy meghatározzuk az indukció hozamát. A legjobb eredményeket akkor kaptuk, amikor a sejteket 3 óra hosszat 30 °C-on 2×YT táptalajban szaporítjuk.



9. Példa

Az Ra12-mECD-PD-C_r-HIS tag fúziós fehérje expressziója *Escherichia coli*-ban

Az egér ECD-PD fúziós fehérjét pET28b expressziós vektorba klónozzuk a 8. példában ismertetett módon. A Ra12 szekvenciát az alábbi polimeráz láncreakció fragmensekkel amplifikáljuk, amik az 5' és 3' végekhez NcoI hasítási helyeket adnak:

Ra12.JC05: 5'-CCCccatggGCACGGCCGCGTCCGATAACT-TCC-3'

(23. számú szekvencia)

Ra12.JC06: 5'-GCGccatggCGGCCGGGGTCCCTCGGCC-3'

(24. számú szekvencia).

Ahhoz, hogy megkapjuk az Ra12 adjuváns fúzióját az mECD-PD-vel, az Ra12 polimeráz láncreakció termékét NcoI restriktív enzimmal emésztjük, majd az NcoI-gyel emésztett és CIAP-pal kezelt pET28b-mECD-PD vektorba ligáljuk. A ligálási terméket NovaBlue sejtekben transzformáljuk, így több telepet kapunk. A nem-irányított, aspecifikus ligálási reakció következtében kétszer annyi telepet izolálunk a plazmid miniprephez. Ezeket a klónokat AfIII restriktív enzimmal végzett emésztéssel vizsgáljuk, hogy az inszertnek helyes-e az orientációja. A néhány helyes orientációjú klón szekvenciáját elemezzük. Az egyik pontos szekvenciájú klónt kompetens BL21 (DE3) CodonPlus-RIU *Escherichia coli* sejtekbe transzformáljuk. Standard mini-expressziós szűrővizsgálatot végzünk a transzformálásból származó klónokkal, hogy meghatározzuk az indukció hozamát. A legjobb



eredményeket akkor kaptuk, amikor a sejteket 3 óra hosszat 37 °C-on LB táptalajban szaporítjuk.

10. Példa

A LeIF. mECD-PD-C₆-HIS tag fúziós fehérje expressziója *Escherichia coli*-ban

Az egér ECD-PD fúziós fehérjét pET28b expressziós vektorba klónozzuk a 8. példában ismertetett módon. Az LeIF szekvenciát az alábbi polimeráz láncreakció fragmensekkel amplifikáljuk, amik NcoI hasítási helyeket adnak az 5' és 3' végekhez:

LeIF.JC03: 5'-CGCccatggCGCAGAATGATAAGATCGCCC-3'
(25. számú szekvencia)

LeIF.JC04: 5'-GCCccatggCGTCGCGCATGAACTTCTTCGT-3'
(26. számú szekvencia).

Ahhoz, hogy megkapjuk a LeIF adjuváns fúzióját az mECD-PD-vel, a LeIF polimeráz láncreakció termékét NcoI restriktációs enzimmal emésztjük, majd az NcoI-gyel emésztett és CIAP-pal kezelt pET28b-mECD-PD vektorba ligáljuk. A ligálási terméket NovaBlue sejtekben transzformáljuk, így több telepet kapunk. A nem-irányított, aspecifikus ligálási reakció következtében kétszer annyi telepet izolálunk a plazmid miniprephez. Ezeket a klónokat KpnI restriktációs enzimmal végzett emésztéssel vizsgáljuk, hogy az inszertnek helyes-e az orientációja. A néhány helyes orientációjú klón szekvenciáját elemezzük. Az egyik pontos szekvenciájú klónt kompetens BL21 (DE3) CodonPlus-RIU *Escherichia coli* sejtekbe transzformáljuk. Standard mini-expressziós szűrővizsgálatot végzünk a transzformálásból származó klónokkal, hogy meghatározzuk az indukció hozamát. A legjobb eredményeket akkor



kaptuk, amikor a sejteket 3 óra hosszat 30 °C-on 2xYT táptalajban szaporítjuk.

11. Példa

Egy ECD-PD fúziós fehérje expressziója *Pichia*-ban

A *Pichia*-ban való expresszióhoz használt ECD-PD rekombináns fehérjét ugyanúgy terveztük meg mint a CHO expresszióhoz, két módosítással: i) a HER-2/neu gén természetes szekrécións szignál szekvenciáját a *Saccharomyces cerevisiae* alfa prepro szignálszekvenciájával helyettesítettük; és ii) a rekombináns fehérje C-terminális részét egy glicinnel és hat hisztidinnel hosszabbítottuk meg.

Az ECD-PD fúziós fehérje expressziós kazettát az SMD1168 *Pichia* törzsbe integráljuk, a szferoplaszt módszer alkalmazásával. Mennyiségi dot blot elemzéssel hat multikópiás, integrálódott klónt szelektálunk körülbelül 250 klónból. A kiválasztott klónokat 72 óra hosszat indukáljuk pufferrel metanol-komplex táptalajban (BMMY-1% metanol) rázott lombikos körülmények között. A hat jelölt klón ugyanazt az expressziós profilt mutatja sejtmentes felülúszókban és össz-celluláris kivonatokban.

A sejtmentes felülúszókban a teljes hosszúságú ECD-PD rekombináns fehérje szekréciónsja nagyon gyenge, és csak Western blottal lehet kimutatni, a c-neu-3 egér ellenanyaggal (Calbiochem). Egy \pm 70 kDa-os fehérje szekréciónsja és akkumulációja ezüsttel festett SDS-PAGE-val látható, és Western blottal mutatható ki, nem-redukáló körülmények között, Herceptin egér ellenanyag használatával. Ezt a fehérjét nem lehetett kimutatni az egér c-neu-3 ellenanyaggal vagy egy egér anti-hisztidin ellenanyaggal (QIAGEN).



Az össz-celluláris kivonatok esetében SDS-PAGE-val nem lehetett specifikus csíkot kimutatni, az ezüstoffestő Daiichi színező kit használatával. Két csíkot lehetett kimutatni Western blottal, az egér c-neu-3 vagy egér anti-hisztidin ellenanyag használatával. Az egyik csíknak ugyanaz a molekulásúlya mint annak, amit a szekretált ECD-PD termékénél figyelhetünk meg, CHO sejtekben való expresszió után. A másik csík „kenődésként” jelentkezett, 100-120 kDa között. Ez a két jel megfelelhet az endoplazmatikus retikulumban visszamaradt ECD-PD rekombináns fehérjéknek felelhet meg, és a glikozilezés különböző formáit képviselhetik.

12. Példa

Az ECD-PD és ECD-ΔPD fúziós fehérjék expressziója CHOK1 sejtekben

A pcDNA3.1/hyg/ECD-PD és pcDNA3.1/hyg/ECD-ΔPD plazmidokat XbaI restriktációs enzimmal emésztjük, majd az ECD-PD és ECD-ΔPD fúziós fehérjéket tartalmazó DNS fragmenseket gélen tisztítjuk 2783 bázispár és 2166 bázispár méretű XbaI fragmensek formájában. A fragmenseket XbaI restriktációs enzimmal linearizált pEE14-GS vektorba (CellTech) visszük át (a klónozó hely a citomegalovírus közvetlen korai promoter után van). A ligálás után a transzformációt kompetens *Escherichia coli* DH5α sejtekbe hajtjuk végre. A restriktációs enzimes emésztéssel elemzett tizenhat telep közül 2 ECD-PD pozitív telepet találtunk, és az egyik pozitív telepről kiderült, hogy ECD-ΔPD pozitív. A kapott plazmidokból nagy mennyiséget állítunk elő, majd kettős CsCl-EtBr gradiens centrifugálással tisztítjuk. A plazmidokat restriktációs enzimes emésztéssel és az inszert valamint a vektor 5'



és 3' kapcsolódási pontjainak szekvenálásával elemezzük, abnormalitásokat nem figyeltünk meg.

A Master Cell Bank-ból származó, szuszpenziós, szérummentes körülmények között tenyésztett MCB CHO-K1 028W 1996/2 SHF P31 CHO-K1 sejtek transzfekcióját mind a pEE14-ECD-PD, mind a pEE14-ECD- Δ PD plazmával elvégezzük, a klasszikus DNS kalcium-foszfát ko-precipitációs technika használatával. A sejteket a transzfekció után 48 órával számláljuk meg, majd 5000 sejt/luk sűrűségben 96 lukas lemezekre visszük. A transzfektált sejteket a Crockett és munkatársai által ismertett glutamin-szintetáz (GS) expressziós rendszer eljárással szelektáljuk [Crockett és mtsai: *Biotech.* **8**, 662 (1990)], majd 30 μ M metionin szulfoximin (MSX) jelenlétében, glutamint nem tartalmazó, adalékanyagokkal (glutamát/aszparagin/nukleozidok) és 5% dializált borjúmagzat szérummal (FBS) kiegészített GMEM táptalajban amplifikáljuk. A sejteket a transzfekció után háromszor mossuk az első héten, majd kétszer mossuk a második héten. A harmadik mosás során 20% kondicionált táptalajt adunk hozzá. Az ötödik mosás során az MSX koncentrációját 50 μ M-ra emeljük, hogy fokozzuk a szelekció szintjét.

Az MSX transzfektáns klónokat a transzfekció után 24-lukas lemezekre visszük át, majd a tenyészet felülúszóját összegyűjtjük. Az ECD-PD vagy ECD- Δ PD fúziós fehérjét Western blot elemzéssel vizsgáljuk, Herceptin ellenanyagot használva, redukáló körülmények között. Az ECD-PD fúziós fehérje expresszióját a vizsgált 52 klónból 18-ban ki lehetett mutatni, míg a vizsgált 47 klónból 13 bizonyult pozitívnak az ECD- Δ PD expresszió szempontjából. A kiválasztott, és a fúziós fehérjét expresszáló klónokat azután re-adaptáljuk a szérummentes körü-



ményekhez. Az expresszió szintje, a növekedés és az életképesség alapján 5, az ECD-PD konstrukciót hordoz klónt és 3, az ECD- Δ PD konstrukciót hordozó klónt tovább értékeljük és jellemezzük. Az ECD-PD konstrukció esetében az 560 F3 klón adta a legmagasabb expressziós szintet.

Az expressziót 33 °C-on értékeljük ki 2 mmol/l nátriumbutiráttal és 2% dimetilszulfid jelenlétében vagy távollétében. A klónok közül néhány indukálható volt NaB-vel vagy dimetilszulfiddal. Az ECD-PD és az ECD- Δ PD CHO-K1 sejtekben való expresszióját Western blottokkal és SDS-PAGE-val elemezzük ezüst vagy Coomassie Blue festés után. A Western blot elemzéshez a Herceptin és a c-neu-3 egér monoklonális ellenanyagokat, valamint a 8029K nyúl poliklonális ellenanyagot használjuk. Az ECD-PD klónokból és az ECD- Δ PD klónokból származó tenyészet felülűszök elemzése egy csíkot adott a Coomassie/ezüst festésű gélekben 150 kDa-nál és 98 kDa-nál. Ugyanazokat a csíkokat lehet megtalálni Herceptinnel és a 8029K poliklonális antiszérummal, valamint a c-neu-3 ellenanyaggal, csak az ECD-PD esetében (18. ábra). A CHO-ban expresszált HER-2/neu fúziós fehérjét felismeri a Herceptin ellenanyag (18. ábra).

A fúziós fehérjék expressziós szintjét is követjük a stabilitás szempontjából, a különböző sejtátoltások során. Öt ECD-PD klónt és két ECD- Δ PD klónt követtünk az átoltások során, és az expresszió stabilitását Western blot elemzéssel értékeljük ki. A hét elemzett klónból négy volt stabil több mint 32 átoltás után, bár közülük az egyik magas mortalitást mutatott, a másoknak pedig nagyok voltak a sejtjei.

Az anyagok kis mennyiségben való előállítását a két legjobb ECD-PD és ECD- Δ PD klónokkal hajtjuk végre. A sejteket szérum-



mentes körülmények között, szuszpenzióban tenyésztjük 120 óra hosszat, 33 °C-on, 2 mmol/l nátrium-butirát jelenlétében. Mindkét fúziós fehérje expresszióját Western blottal értékeljük ki, herceptin ellenanyagot és SDS-PAGE-t használva a Daiichi kittel végzett ezüstoffestés után. Mindkét fúziós fehérjéről kiderült, hogy $\pm 100 \mu\text{g/ml}$ koncentrációban expresszálódik.

13. Példa

Az ECD-PD és az ECD- Δ PD fúziós fehérjék tisztítása CHO sejtekben való expresszió után

A CHO sejtekben való expresszió és szekréció után az ECD-PD és ECD- Δ PD fúziós fehérjéket anioncserélő kromatográfiával tisztítjuk Q Sepharose nagynyomású folyadékkromatográfiás oszlopokon. Mielőtt a felülúszót az oszlopra visszük, a pH-t 1 mol/l sósav hozzáadásával 6,5-re állítjuk. A kromatográfiához 1 ml Q Sepharose nagyteljesítményű gyantát (Pharmacia)) használunk egy C10/10 oszlopban (Pharmacia)).

Az oszlopot először 10 oszloptérfogatnyi vízzel hozzuk egyensúlyba, 4 ml/perc sebességgel, majd 1 oszloptérfogatnyi 0,5 mol/l nátrium-hidroxiddal 4 ml/perc sebességgel, és 10 oszloptérfogatnyi A pufferrel (20 mmol/l Bisz-TRISZ propán, pH=6,5, 50 mmol/l nátrium-klorid), 4 ml/perc sebességgel. A mintát azután felvisszük az oszlopra, és hagyjuk, hogy 1 ml/perc sebességgel átáramoljon az oszlopon. Az oszlopot azután A pufferrel mossuk 1 ml/perc sebességgel, addig, amíg az OD₂₈₀ érték el nem éri a 0,1-et, majd egy további 20 oszloptérfogatnyi mosási lépést is alkalmazunk. Az elúció előtt az áramlás irányát visszafordítjuk, és egy újabb, 3 oszloptérfogatnyi mosási lépést alkalmazunk.



Az eluálást 1 ml/perc sebességgel hajtjuk végre, először B pufferrel (20 mmol/l Bisz-TRISZ propán pH=6,5, 250 mmol/l nátrium-klorid), majd C pufferrel (20 mmol/l Bisz-TRISZ propán, pH=6,5, 1 mmol/l nátrium-klorid). A számunkra érdekes fúziós fehérjéket B pufferrel eluáljuk.

A fúziós fehérjéket tovább tisztítjuk hidrofób kromatográfiával, alacsony helyettesítésű Phenyl Sepharose 6 Fast Flow tölteten. Az ECD-PD és ECD- Δ PD fúziós fehérjéket tartalmazó eluátumot (B puffer eluátum) úgy állítjuk be, hogy 1 mol/l ammónium-szulfát (AMS) koncentrációt kapjunk szilárd ammónium-szulfát (140 g/liter oldat) hozzáadásával. Az oldat pH-ját ellenőrizzük, hogy 7,0 legyen.

A kromatográfiához 0,5 ml alacsony helyettesítésű Phenyl Sepharose 6 Fast Flow töltetet (Pharmacia)) használunk C10/10-zel (Pharmacia)). Az oszlopot azután 10 oszloptérfogatnyi vízzel hozzuk egyensúlyba, 4 ml/perc sebességgel, 1 oszloptérfogatnyi 0,5 mol/l nátrium-hidroxiddal, 4 ml/perc sebességgel, majd 10 oszloptérfogatnyi D pufferrel (1 mmol/l foszfát pH=7,0, 1 mol/l ammónium-szulfát), 4 ml/perc sebességgel. Az egyensúlyba hozást követően a mintát felvisszük, és hagyjuk, hogy 0,5 ml/perc sebességgel átáramoljon az oszlopon. Az oszlopot azután D pufferrel mossuk 0,5 ml/perc sebességgel, addig, amíg az OD₂₈₀ el nem éri az alapvonalat, majd pedig 1 ml/perc sebességgel, 10 oszloptérfogatnyi mennyiséget használva. Az eluálás előtt az áramlás irányát megfordítjuk, és egy további, 3 oszloptérfogatnyi mosási lépést hajtunk végre. Az eluálást 1 ml/perc sebességgel hajtjuk végre, E puffert használva (1 mmol/l foszfát, pH=7,0).

A tisztított fúziós fehérjéket SDS-PAGE-val elemezzük, majd a Daiichi kittel ezüstfestést végzünk és Western blottot hajtunk



vége, a 8029K nyúl poliklonális ellenanyag vagy a Herceptin ellenanyag használatával. Az elemzés azt mutatta, hogy a tisztaság szintje a két tisztítási lépés után denzitométerrel mérve $\pm 90\%$ (Biorad GS-700 Imaging Densitometer). A Western blot elemzés azt mutatta, hogy a tisztítás során a monomerek maradnak a fő csíkban, az oxidáció szintje nem növekedett, és a számunkra érdekes epitop kimutatását nem módosítják a tisztítás körülményei, amint azt a Herceptin ellenanyag használatával lehet igazolni. Az egyes kinyert fúziós fehérjék össz-mennyiségét kolorimetriás fehérje-esszével mérjük (DOC TCA BCA). Ezzel az esszével a becslések szerint 2 és 4 mg ECD-PD és ECD- Δ PD fúziós fehérjét tisztítottunk 75 ml tenyészetből, és a tisztaság szintje $\pm 90\%$.



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Izolált fehérje, ami tartalmazza a HER-2/neu extraceluláris doménjét, egy HER-2/neu foszforilációs doménhez fúzionáltatva, amely fehérje képes immunválaszt gerjeszteni egy melegvérű állatban.

2. Az 1. igénypont szerinti fehérje, amely fehérje szekvenciája legalább 80%-ban azonos a 6. számú szekvenciával, vagy amely fehérje tartalmaz egy olyan szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 3. számú szekvenciával, egy olyan szekvenciához fúzionáltatva, ami legalább 80%-ban azonos a 4. számú szekvenciával.

3. Az 1. igénypont szerinti fehérje, amely fehérje tartalmaz egy olyan szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 3. számú szekvenciával, közvetlenül fúzionáltatva egy olyan aminosav szekvenciához, ami legalább 80%-ban azonos azzal a szekvenciával, ami tartalmazza a 2. számú szekvencia 991-es (Gln) és 1256-os (Val) csoportjai közötti szakaszt, vagy amely fehérje tartalmaz egy olyan szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 3. számú szekvenciával, egy olyan aminosav szekvenciához fúzionáltatva, ami legalább 80%-ban azonos azzal a szekvenciával, ami tartalmazza a 2. számú szekvencia 991-es (Gln) és 1256-os (Val) csoportjai közötti szakaszt.

4. Az 1. igénypont szerinti fehérje, amely fehérje tartalmaz egy olyan szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 8. számú szekvenciával, közvetlenül fúzionáltatva egy olyan aminosav szekvenciához, ami legalább 80%-ban azonos a 4. számú szekvenciával, vagy amely fehérje tartalmaz egy olyan szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 8. számú szekvenciával, egy



olyan aminosav szekvenciához fúzionáltatva, ami legalább 80%-ban azonos a 8. számú szekvenciával.

5. Az 1. igénypont szerinti fehérje, amely fehérje tartalmaz egy olyan szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 8. számú szekvenciával, közvetlenül fúzionáltatva egy olyan aminosav szekvenciához, ami tartalmazza a 2. számú szekvencia 991-es (Gln) és 1256-os (Val) csoportjai közötti szakaszt, vagy amely fehérje tartalmaz egy olyan szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 8. számú szekvenciával, egy olyan aminosav szekvenciához fúzionáltatva, ami legalább 80%-ban azonos azzal az aminosav szekvenciával, ami tartalmazza a 2. számú szekvencia 991-es (Gln) és 1256-os (Val) csoportjai közötti szakaszt.

6. Az 1. igénypont szerinti fehérje, amiben a HER-2/neu extracelluláris doménje egy kémiai linkerrel keresztül fúzionáltatva van a HER-2/neu foszforilációs doménjéhez.

7. A 6. igénypont szerinti fehérje, amiben a kémiai linker egy aminosav linker.

8. Nukleinsav molekula, ami az 1. igénypont szerinti fehérjét kódolja.

9. Virális vektor, ami az 1. igénypont szerinti fehérjét kódoló polinukleotid szekvenciát tartalmazza.

10. Gyógyászati készítmény, ami tartalmazza az 1. igénypont szerinti fehérjét, valamint egy gyógyászatiilag elfogadható hordozót vagy higítószeret.

11. A 10. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, aholis a gyógyászati készítmény egy vakcina.

12. A 10. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, ami tartalmaz még egy immunstimuláns anyagot.



13. A 12. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amiben a fehérjét egy olaj-a-vízben emulzióban prezentáljuk.

14. A 12. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amiben az immunstimuláns anyag az SBAS2, a 3D-MPL, a QS21 vagy a 3D-MPL és a QS21 kombinációja.

15. Gyógyászati készítmény, ami tartalmazza a 8. igénypont szerinti nukleinsav molekulát, valamint egy gyógyászatilag elfogadható hordozót vagy higítószert.

16. A 15. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, aholis a gyógyászati készítmény egy vakcina.

17. A 15. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, ami tartalmaz még egy immunstimuláns anyagot is.

18. A 15. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amiben a nukleinsav molekula egy DNS molekula.

19. Eljárás egy HER-2/neu fehérje elleni immunválasz kiváltására vagy fokozására, azzal jellemezve, hogy az eljárás abból áll, hogy egy melegvérű állatnak az 1. igénypont szerinti fehérjét adjuk be, olyan mennyiségben, ami elég ahhoz, hogy az immunválaszt kiváltsa vagy fokozza.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fehérjét vakcina formájában adjuk be.

21. Eljárás a HER-2/neu fehérje elleni immunválasz kiváltására vagy fokozására, azzal jellemezve, hogy az eljárás során egy melegvérű állatnak a 8. igénypont szerinti nukleinsav molekulát adjuk be olyan mennyiségben, ami elég ahhoz, hogy kiváltsa vagy fokozza az immunválaszt.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nukleinsav molekula vakcina formában van.

23. A 21. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a beadási lépés magában foglalja a melegvérű állat sejtjeinek *ex vivo* transzfekcióját a nukleinsav molekulával, majd ezt követően a transzfektált sejtek beadását a melegvérű állatnak.

24. Eljárás a HER-2/neu fehérje elleni immunválasz kiváltására vagy fokozására, azzal jellemezve, hogy az eljárás során egy melegvérű állatnak a 9. igénypont szerinti virális vektort adjuk be, olyan mennyiségben, ami elegendő az immunválasz kiváltásához vagy fokozásához.

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a beadási lépés magában foglalja a melegvérű állat sejtjeinek *ex vivo* fertőzését a virális vektorral, majd ezt követően a fertőzött sejtek bejuttatását a melegvérű állatba.

26. Izolált fehérje, ami tartalmazza a HER-2/neu extracelluláris domént a HER-2/neu foszforilációs doménjének egy fragmenséhez fúzionáltatva, amely fehérje képes immunválaszt gerjeszteni egy melegvérű állatban.

27. A 26. igénypont szerinti fehérje, amely fehérjének a szekvenciája legalább 80%-ban azonos a 7. számú szekvenciával, vagy amely fehérje egy olyan szekvenciát tartalmaz, ami legalább 80%-ban azonos a 3. számú szekvenciával, egy olyan szekvenciához fúzionáltatva, ami legalább 80%-ban azonos az 5. számú szekvenciával.

28. A 26. igénypont szerinti fehérje, ami tartalmaz egy olyan szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 3. számú szekvenciával, közvetlenül fúzionáltatva egy olyan szekvenciához, ami legalább 80%-ban azonos azzal az aminosav szekvenciával, ami tartalmazza a 2. számú szekvencia 991-es (Gln) és 1049-es (Arg) aminosavai által határolt szakaszt, vagy amely fehérje tar-



talmaz egy szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 3. számú szekvenciával, egy olyan szekvenciához fúzionáltatva, ami legalább 80%-ban azonos 2. számú szekvencia 991-es (Gln) és 1049-es (Arg) aminosavai által határolt szakasszal.

29. A 26. igénypont szerinti fehérje, amely fehérje tartalmaz egy szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 8. számú szekvenciával, közvetlenül fúzionáltatva egy olyan szekvenciához, ami legalább 80%-ban azonos az 5. számú szekvenciával, vagy amiben a fehérje tartalmaz egy olyan szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 8. számú szekvenciával, egy olyan szekvenciához fúzionáltatva, ami legalább 80%-ban azonos az 5. számú szekvenciával.

30. A 26. igénypont szerinti fehérje, amely fehérje tartalmaz egy szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 8. számú szekvenciával, közvetlenül fúzionáltatva egy olyan szekvenciához, ami legalább 80%-ban azonos egy olyan aminosav szekvenciával, ami a 2. számú szekvencia 991-es (Gln) és 1049-es (Arg) csoportjait tartalmazza, vagy amely fehérje tartalmaz egy olyan szekvenciát, ami amely fehérje tartalmaz egy szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 8. számú szekvenciával, közvetlenül fúzionáltatva egy olyan szekvenciához, ami legalább 80%-ban azonos a 2. számú szekvencia 991-es (Gln) és 1049-es (Arg) csoportjait tartalmazó aminosav szekvenciával.

31. A 26. igénypont szerinti fehérje, amiben a HER-2/neu extracelluláris domén a HER-2/neu foszforilációs doménjéhez egy kémiai linkeren keresztül kapcsolódik.

32. A 31. igénypont szerinti fehérje, amiben a kémiai linker egy aminosav linker.



33. Nukleinsav molekula, ami a 26. igénypont szerinti fehérjét kódolja.

34. Virális vektor, ami a 26. igénypont szerinti fehérjét kódoló polinukleotid szekvenciát tartalmaz.

35. Gyógyászati készítmény, ami tartalmazza a 26. igénypont szerinti fehérjét, valamint egy gyógyászatilag elfogadható hordozót vagy higítószert.

36. A 35. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, aholis a gyógyászati készítmény egy vakcina.

37. A 35. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, ami emellett tartalmaz még egy immunstimuláló anyagot.

38. A 37. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amiben a fehérjét egy olaj-a-vízben emulzióban prezentáljuk.

39. A 37. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amiben az immunstimuláns anyag az SBAS2, a 3D-MPL, a QS21, vagy a 3D-MPL és a QS21 kombinációja.

40. Gyógyászati készítmény, ami tartalmazza a 33. igénypont szerinti nukleinsav molekulát, valamint tartalmaz egy gyógyászatilag elfogadható hordozót vagy higítószert.

41. A 40. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, aholis a gyógyászati készítmény egy vakcina.

42. A 40. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, ami tartalmaz még egy immunstimuláns anyagot is.

43. A 40. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amiben a nukleinsav molekula egy DNS molekula.

44. Eljárás HER-2/neu fehérje elleni immunválasz kiváltására vagy fokozására, azzal jellemezve, hogy az eljárásban egy melegvérű állatnak a 26. igénypont szerinti vegyületből olyan



mennyiséget adunk be, ami hatásos az immunválasz kiváltásában vagy fokozásában.

45. A 44. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fehérjét vakcina formájában adjuk be.

46. Eljárás HER-2/neu fehérje elleni immunválasz kiváltására vagy fokozására, azzal jellemezve, hogy az eljárásban egy melegvérű állatnak a 33. igénypont szerinti nukleinsav molekulából olyan mennyiséget adunk be, ami hatásos az immunválasz kiváltásában vagy fokozásában.

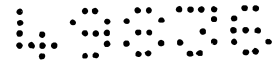
47. A 46. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nukleinsav molekula vakcina formában van.

48. A 46. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a beadási lépés magában foglalja a melegvérű állat sejtjeinek *ex vivo* transzfektálását a nukleinsav molekulával, majd ezt követően a transzfektált sejtek bejuttatását a melegvérű állatba.

49. Eljárás HER-2/neu fehérje elleni immunválasz kiváltására vagy fokozására, azzal jellemezve, hogy az eljárásban egy melegvérű állatnak a 34. igénypont szerinti virális vektorból olyan mennyiséget adunk be, ami hatásos az immunválasz kiváltásában vagy fokozásában.

50. A 49. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a beadási lépés magában foglalja a melegvérű állat sejtjeinek *ex vivo* fertőzését a virális vektorral és ezt követően a fertőzött sejteket beadjuk a melegvérű állatnak.

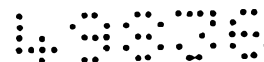
51. Izolált fehérje, ami tartalmazza a HER-2/neu extracelluláris domént, egy HER-2/neu intracelluláris doménhez fúzionáltatva, amely fehérje képes immunválaszt gerjeszteni egy melegvérű állatban.



52. Az 51. igénypont szerinti fehérje, aholis a fehérje tartalmaz egy szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 3. számú szekvenciával, közvetlenül fúzionáltatva egy olyan szekvenciához, ami legalább 80%-ban azonos azzal az aminosav szekvenciával, ami az 1. számú szekvencia 676-os (Lys) csoportjától a 1255-ös (Val) csoportjáig terjedő szakaszt tartalmazza, vagy amiben a fehérje tartalmaz egy szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 3. számú szekvenciával, legalább egy kémiai vagy aminosav kapcsoló csoporton keresztül egy olyan szekvenciához fúzionáltatva, ami legalább 80%-ban azonos azzal az aminosav szekvenciával, ami az 1. számú szekvencia 676-os (Lys) csoportjától a 1255-ös (Val) csoportjáig terjedő szakaszt tartalmazza.

53. Az 51. igénypont szerinti fehérje, aholis a fehérje tartalmaz egy szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 3. számú szekvenciával, közvetlenül fúzionáltatva egy olyan szekvenciához, ami legalább 80%-ban azonos azzal az aminosav szekvenciával, ami a 2. számú szekvencia 677-es (Lys) csoportjától a 1256-os (Val) csoportjáig terjedő szakaszt tartalmazza, vagy amiben a fehérje tartalmaz egy szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 3. számú szekvenciával, legalább egy kémiai vagy aminosav kapcsoló csoporton keresztül egy olyan szekvenciához fúzionáltatva, ami legalább 80%-ban azonos azzal az aminosav szekvenciával, ami a 2. számú szekvencia 677-es (Lys) csoportjától a 1256-os (Val) csoportjáig terjedő szakaszt tartalmazza.

54. Az 51. igénypont szerinti fehérje, aholis a fehérje tartalmaz egy szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 3. számú szekvenciával, közvetlenül fúzionáltatva egy olyan szekvenciához, ami legalább 80%-ban azonos azzal az aminosav szekvenciával, ami az 1. számú szekvencia 676-os (Lys) csoportjától a 1255-ös



(Val) csoportjáig terjedő szakaszt tartalmazza, vagy amiben a fehérje tartalmaz egy szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 8. számú szekvenciával, legalább egy kémiai vagy aminosav kapcsoló csoporton keresztül egy olyan szekvenciához fúzionáltatva, ami legalább 80%-ban azonos azzal az aminosav szekvenciával, ami az 1. számú szekvencia 676-os (Lys) csoportjától a 1255-ös (Val) csoportjáig terjedő szakaszt tartalmazza.

55. Az 51. igénypont szerinti fehérje, aholis a fehérje tartalmaz egy szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 8. számú szekvenciával, közvetlenül fúzionáltatva egy olyan szekvenciához, ami legalább 80%-ban azonos azzal az aminosav szekvenciával, ami a 2. számú szekvencia 677-es (Lys) csoportjától a 1256-os (Val) csoportjáig terjedő szakaszt tartalmazza, vagy amiben a fehérje tartalmaz egy szekvenciát, ami legalább 80%-ban azonos a 8. számú szekvenciával, legalább egy kémiai vagy aminosav kapcsoló csoporton keresztül egy olyan szekvenciához fúzionáltatva, ami legalább 80%-ban azonos azzal az aminosav szekvenciával, ami a 2. számú szekvencia 677-es (Lys) csoportjától a 1256-os (Val) csoportjáig terjedő szakaszt tartalmazza.

56. Az 51. igénypont szerinti fehérje, amiben a HER-2/neu extracelluláris domén egy kémiai linkerrel keresztül kapcsolódik a HER-2/neu intracelluláris doménhez.

57. Az 56. igénypont szerinti fehérje, amiben a kémiai linker egy aminosav linker.

58. Nukleinsav molekula, ami az 51. igénypont szerinti fehérjét kódolja.

59. Virális vektor, ami az 51. igénypont szerinti fehérjét kódoló polinukleotid szekvenciát tartalmazza.



60. Gyógyászati készítmény, ami tartalmazza az 51. igénypont szerinti fehérjét, valamint egy gyógyászatiilag elfogadható hordozót vagy hígítószeret.

61. A 60. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, aholis a gyógyászati készítmény egy vakcina.

62. A 60. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, ami tartalmaz még egy immunstimuláló anyagot is.

63. A 62. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amiben a fehérjét egy olaj-a-vízben emulzióban prezentáljuk.

64. A 62. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amiben az immunstimuláns anyag az SBAS2, a 3D-MPL, a QS21 vagy a 3D-MPL és a QS21 kombinációja.

65. Gyógyászati készítmény, ami tartalmazza az 58. igénypont szerinti nukleinsav molekulát, valamint egy gyógyászatiilag elfogadható hordozót vagy hígítószeret.

66. A 65. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, aholis a gyógyászati készítmény egy vakcina.

67. A 65. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, ami tartalmaz még egy immunstimuláns anyagot is.

68. A 65. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amiben a nukleinsav molekula egy DNS molekula.

69. Eljárás egy HER-2/neu fehérje elleni immunválasz kiváltására vagy fokozására, azzal jellemezve, hogy az eljárás abból áll, hogy egy melegvérű állatnak az 51. igénypont szerinti fehérjét adjuk be, olyan mennyiségben, ami elég ahhoz, hogy az immunválaszt kiváltsa vagy fokozza.

70. A 69. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fehérjét vakcina formájában adjuk be.



71. Eljárás a HER-2/neu fehérje elleni immunválasz kiváltására vagy fokozására, azzal jellemezve, hogy az eljárás során egy melegvérű állatnak az 58. igénypont szerinti nukleinsav molekulát adjuk be olyan mennyiségben, ami elég ahhoz, hogy kiváltsa vagy fokozza az immunválaszt.

72. A 71. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nukleinsav molekula vakcina formában van.

73. A 71. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a beadási lépés magában foglalja a melegvérű állat sejtjeinek *ex vivo* transzfekcióját a nukleinsav molekulával, majd ezt követően a transzfektált sejtek beadását a melegvérű állatnak.

74. Eljárás a HER-2/neu fehérje elleni immunválasz kiváltására vagy fokozására, azzal jellemezve, hogy az eljárás során egy melegvérű állatnak az 59. igénypont szerinti virális vektort adjuk be, olyan mennyiségben, ami elegendő az immunválasz kiváltásához vagy fokozásához.

75. A 74. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a beadási lépés magában foglalja a melegvérű állat sejtjeinek *ex vivo* fertőzését a virális vektorral, majd ezt követően a fertőzött sejtek bejuttatását a melegvérű állatba.

76. Eljárás a rák kifejlődésének megakadályozására egy betegben, azzal jellemezve, hogy az eljárás abból áll, hogy a betegnek hatásos mennyiséget adunk be az 1., 26. vagy 51. igénypont szerinti fúziós polipeptidből, ezzel gátolva a rák kifejlődését a betegben.

77. Eljárás a rák kifejlődésének megakadályozására egy betegben, azzal jellemezve, hogy az eljárás abból áll, hogy a betegnek hatásos mennyiséget adunk be a 8., 33. vagy 58. igény-



pont szerinti polinukleotidból, ezzel gátolva a rák kifejlődését a betegben.

78. Eljárás a rák kifejlődésének megakadályozására egy betegben, azzal jellemezve, hogy az eljárás abból áll, hogy a betegnek hatásos mennyiséget adunk be az 1., 26. vagy 51. igénypont szerinti fúziós polipeptidet expresszázó antigén-prezentáló sejtéből, ezzel gátolva a rák kifejlődését a betegben.

79. A 78. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az antigént prezentáló sejt egy dendrit sejt.

80. A 76-79. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a rák emlő-, petefészek-, vastagbél-, tüdő- vagy prosztaták.

81. Eljárás tumorsejteknek egy biológiai mintából való eltávolítására, azzal jellemezve, hogy az eljárás abból áll, hogy a biológiai mintát olyan T-sejtekkel hozzuk érintkezésbe, amik specifikusan reagálnak egy HER-2/neu fúziós fehérjével, és a fúziós fehérje tartalmaz egy aminosav szekvenciát, amit az alábbi csoportba tartozó polinukleotid szekvencia kódol:

i) a 8., 33. vagy 58. számú szekvenciavázlaton bemutatott polinukleotid; és

ii) az előzőekben említett polinukleotidok komplementerei; amely lépést olyan körülmények között és annyi ideig hajtunk végre, ami lehetővé teszi az antigént expresszázó sejtek eltávolítását a mintából.

82. A 81. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a biológiai minta vér, vagy annak egy frakciója.

83. Eljárás rák kifejlődésének gátlására egy betegben, azzal jellemezve, hogy a betegnek a 81. igénypont szerint kezelt biológiai mintát adunk be.



84. Eljárás egy HER-2/neu fúziós fehérjére specifikus T-sejtek stimulálására és/vagy expandálására, azzal jellemezve, hogy az eljárás tartalmazza azt a lépést, amiben a T-sejteket az alábbiak közül eggyel hozzuk érintkezésbe:

- i) az 1., 26. vagy 51. igénypont szerinti fúziós fehérje;
- ii) egy ilyen fúziós fehérjét kódoló polinukleotid; vagy
- iii) egy ilyen fúziós fehérjét expresszáló antigént prezentáló sejt;

olyan körülmények között és annyi ideig, amik lehetővé teszik a T-sejtek stimulálását és/vagy expanzióját.

85. Izolált T-sejt populáció, ami a 84. igénypont szerinti eljárással készített T-sejteket tartalmaz.

86. Eljárás rák kifejlődésének gátlására egy betegben, azzal jellemezve, hogy az eljárás tartalmazza azt a lépést, amelyben a betegnek hatásos mennyiségű, 85. igénypont szerinti T-sejt populációt adunk be.

87. Eljárás rák kifejlődésének gátlására egy betegben, azzal jellemezve, hogy az eljárás tartalmazza az alábbi lépéseket:

a) egy betegből izolált CD4⁺ és/vagy CD8⁺ T-sejteket inkubálunk legalább egy, az alábbi csoportba tartozó komponenssel:

- i) az 1., 26. vagy 51. igénypont szerinti fúziós fehérje;
- ii) egy ilyen fúziós fehérjét kódoló polinukleotid; vagy
- iii) egy ilyen fúziós fehérjét expresszáló antigént prezentáló sejt;

oly módon, hogy a T-sejtek szaporodnak, és

b) a betegnek hatékony mennyiséget adunk be az elszaporodott T-sejtekből, ezzel gátolva a rák kifejlődését a betegben.

88. Eljárás rák kifejlődésének gátlására egy betegben, azzal jellemezve, hogy az eljárás tartalmazza az alábbi lépéseket:

a) egy betegből izolált CD4⁺ és/vagy CD8⁺ T-sejteket inkubálunk legalább egy, az alábbi csoportba tartozó komponenssel:

i) az 1., 26. vagy 51. igénypont szerinti fúziós fehérje;

ii) egy ilyen fúziós fehérjét kódoló polinukleotid; vagy

iii) egy ilyen fúziós fehérjét expresszáló antigént prezentáló sejt;

oly módon, hogy a T-sejtek szaporodnak;

b) legalább egy elszaporodott sejtet klónozzunk; és

c) a betegnek hatékony mennyiséget adunk be a klónozott T-sejtekből, ezzel gátolva a rák kifejlődését a betegben.

89. Eljárás az 1., 26. vagy 51. igénypont szerinti fúziós fehérje előállítására, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

a) egy sejtbe egy expressziós vektort juttatunk be, ami tartalmazza a 8., 33. vagy 58. igénypont szerinti polinukleotidot;

b) tenyésztjük a transzfektált sejteket; és

c) tisztítjuk az expresszált fehérjét.

90. A 89. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a sejt CHO sejt.

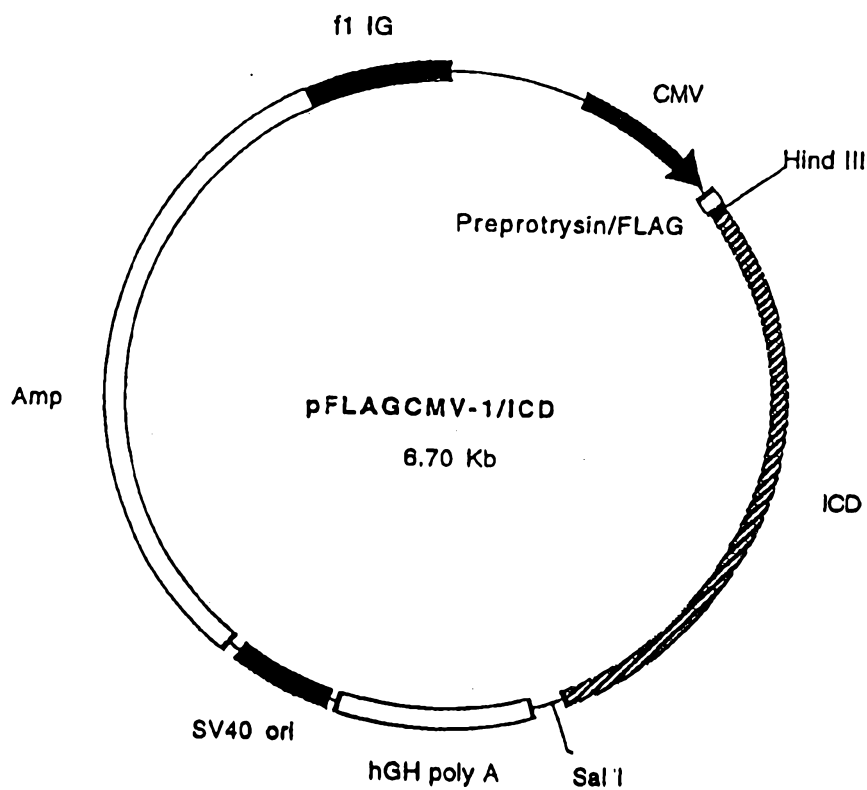
91. A 89. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az expresszált fehérjét egy kétlépéses eljárással tisztítjuk, és az eljárás az alábbi lépésekből áll:

a) anioncserélő kromatográfia \odot Sepharose High Performance oszlopokon; és

b) hidrofób kromatográfia alacsony helyettesítésű Phenyl Sepharose 6 Fast Flow oszlopon.

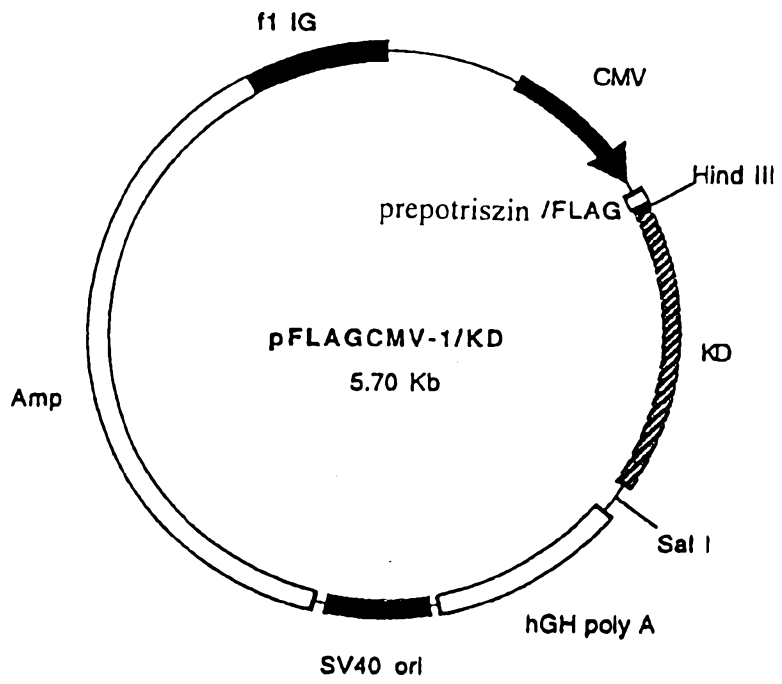


ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

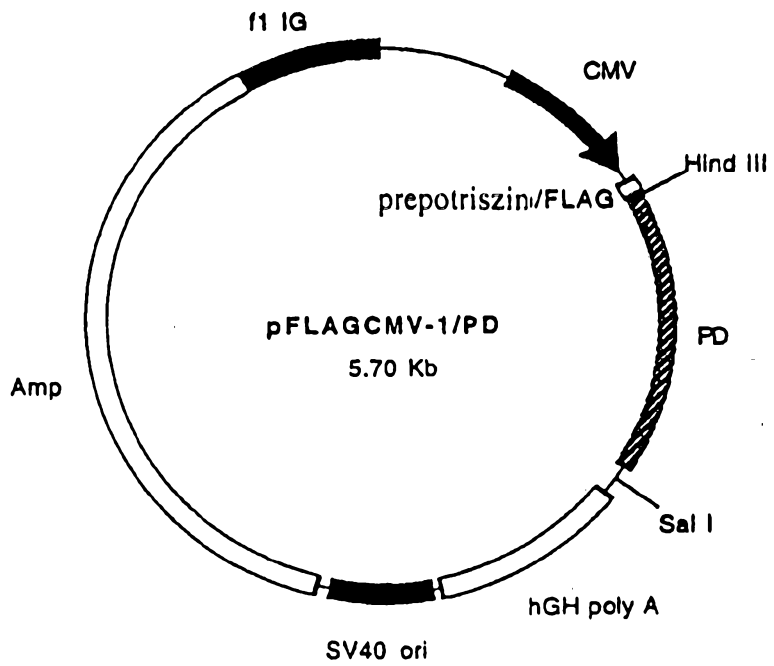


1. ÁBRA

2. ÁBRA



3. ÁBRA



4. ÁBRA

ICD

KD

PD

közeg
lízátum

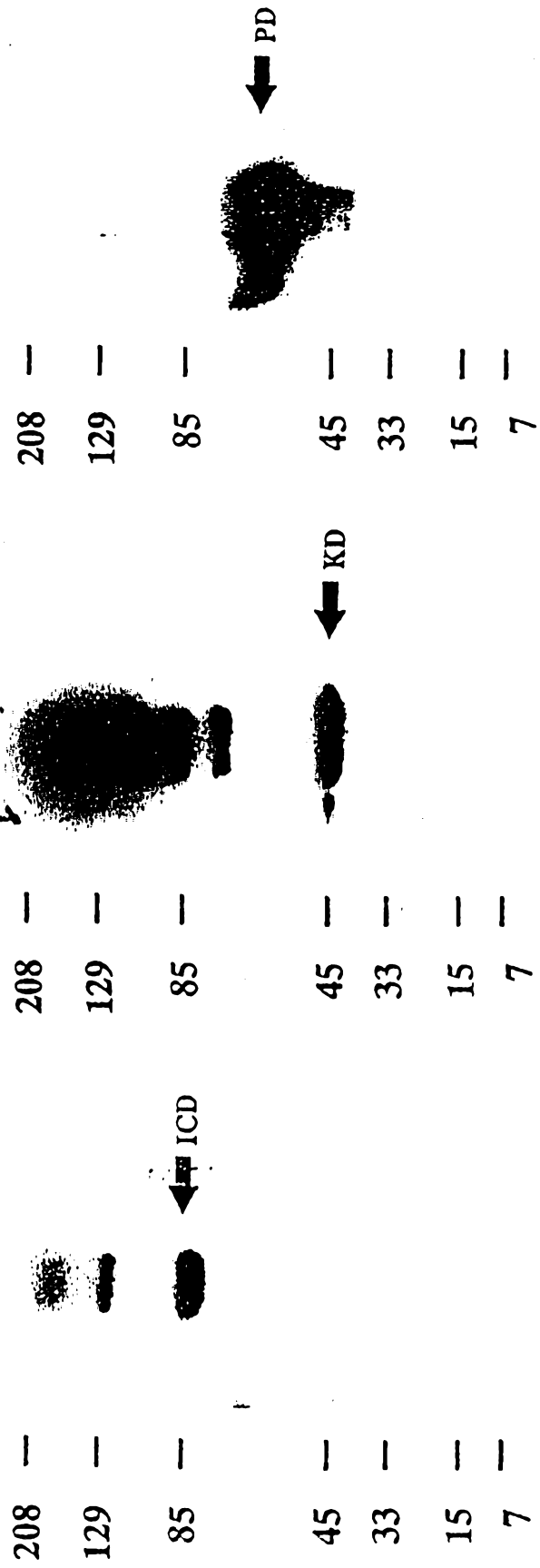
közeg
lízátum

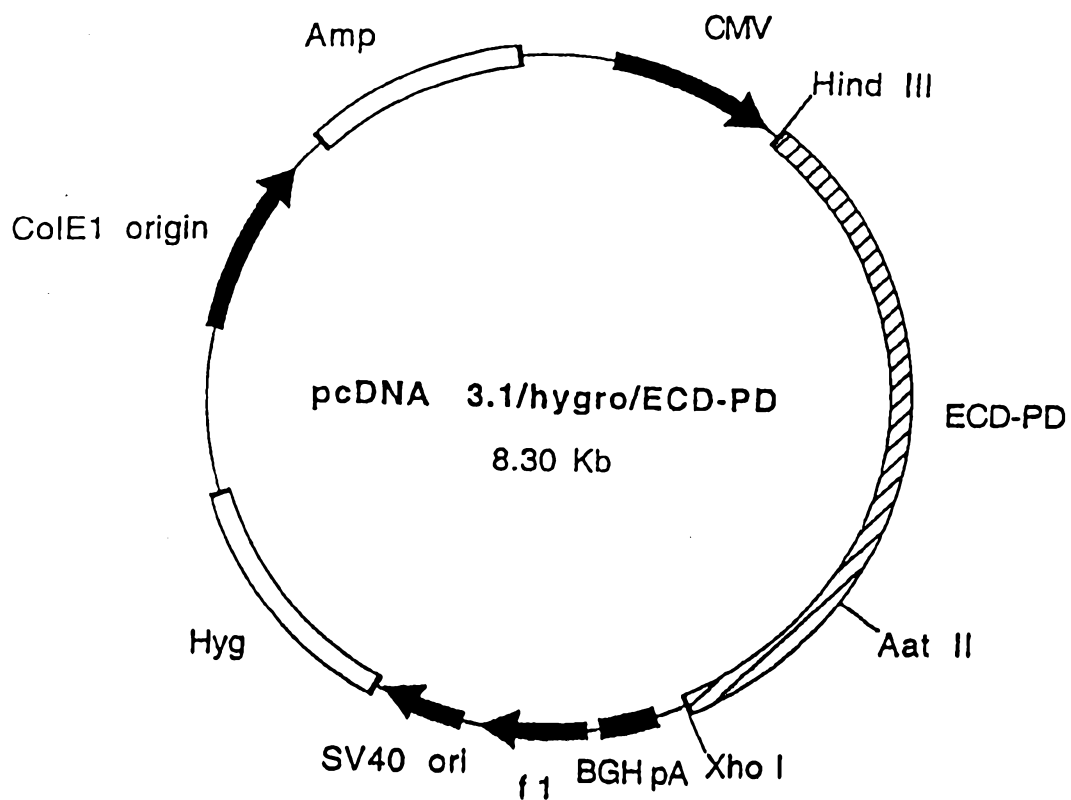
közeg
lízátum

MW (KD)

MW (KD)

MW (KD)



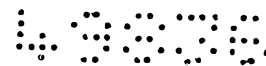


5. ÁBRA



7. ÁBRA (1.sz. szekvencia)

	10		20	
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu Pro Pro Gly Ala				20
Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu				40
Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu				60
Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val				80
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg				100
	110		120	
Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly				120
Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu				140
Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln				160
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala				180
Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys				200
	210		220	
Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys				220
Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys				240
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His				260
Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu				280
Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro				300
	310		320	
Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln				320
Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg				340
Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn				360
Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser				380
Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe				400
	410		420	
Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro				420
Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala				440
Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu				460
Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val				480
Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro				500
	510		520	
Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys				520
Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys				540
Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys				560
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu				580
Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys				600



7. ÁBRA (1.sz. szekvencia)

	610	620	
Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu			620
Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys			640
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly			660
Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln			680
Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu			700
	710	720	
Thr Pro Ser Gly Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu			720
Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile Trp Ile			740
Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser			760
Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro			780
Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu			800
	810	820	
Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly Ser Gln			820
Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg			840
Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys			860
Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp			880
Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg Arg Phe Thr			900
	910	920	
His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala			920
Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg			940
Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met			960
Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met Ala			980
Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu			1000
	1010	1020	
Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala			1020
Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly			1040
Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr			1060
Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly			1080
Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser			1100
	1110	1120	
Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu			1120
Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val			1140
Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala			1160
Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val			1180
Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln			1200
	1210	1220	
Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp Asn Leu			1220
Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr			1240
Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro Val . . .			1257

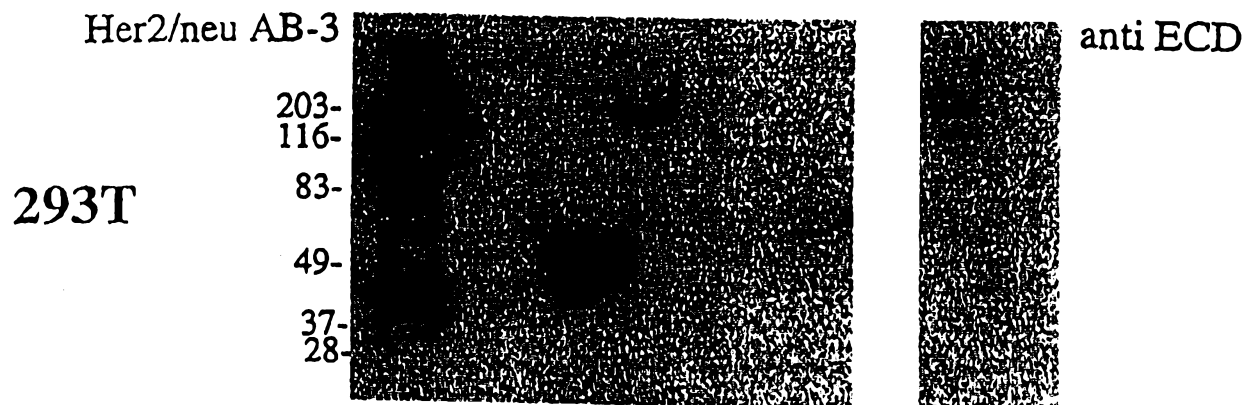
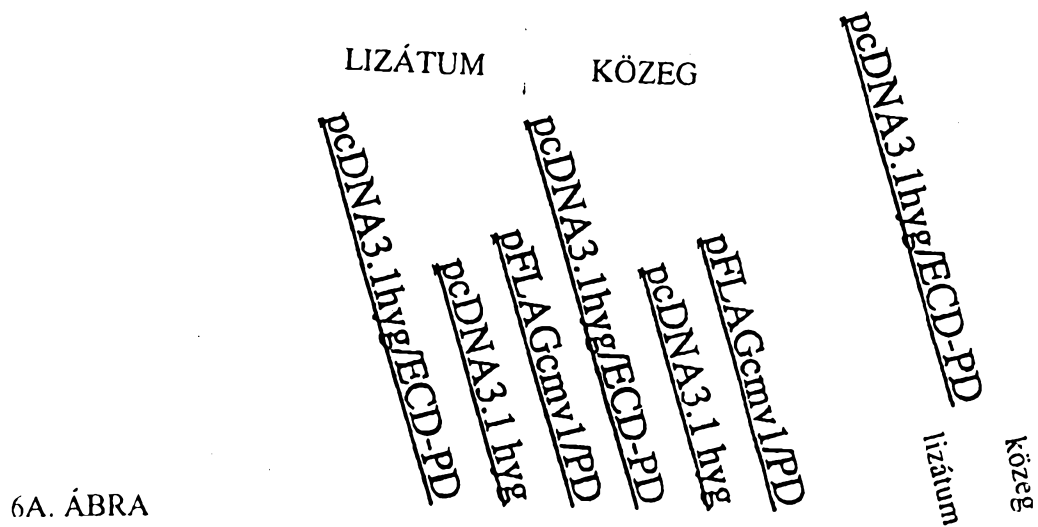


8. ÁBRA (2.sz. szekvencia)

	10		20	
Met Glu Leu Ala Ala Trp Cys Arg Trp Gly Phe Leu Leu Ala Leu Leu Pro Pro Gly Ile				20
Ala Gly Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu				40
Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu				60
Glu Leu Thr Tyr Val Pro Ala Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val				80
Gln Gly Tyr Met Leu Ile Ala His Asn Gln Val Lys Arg Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg				100
	110		120	
Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Lys Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Arg				120
Asp Pro Gln Asp Asn Val Ala Ala Ser Thr Pro Gly Arg Thr Pro Glu Gly Leu Arg Glu				140
Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Arg Gly Asn Pro				160
Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Met Val Leu Trp Lys Asp Val Phe Arg Lys Asn Asn Gln Leu				180
Ala Pro Val Asp Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys Pro Pro Cys Ala Pro Ala Cys				200
	210		220	
Lys Asp Asn His Cys Trp Gly Glu Ser Pro Glu Asp Cys Gln Ile Leu Thr Gly Thr Ile				220
Cys Thr Ser Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Arg Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln				240
Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn				260
His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe				280
Glu Ser Met His Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Thr Cys				300
	310		320	
Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Glu Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Pro Asn Asn				320
Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala				340
Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Gly Ala Arg Ala Ile Thr Ser Asp				360
Asn Val Gln Glu Phe Asp Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu				380
Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ser Ser Gly Ile Ala Pro Leu Arg Pro Glu Gln Leu Gln Val				400
	410		420	
Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu				420
Arg Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Arg Ile Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asp Gly				440
Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile His Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg				460
Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His Arg Asn Ala His Leu Cys Phe Val His Thr				480
Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Ser Gly Asn Arg				500
	510		520	
Pro Glu Glu Asp Cys Gly Leu Glu Gly Leu Val Cys Asn Ser Leu Cys Ala His Gly His				520
Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser His Phe Leu Arg Gly Gln Glu				540
Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Trp Lys Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Ser Asp Lys Arg				560
Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Ser Ser Glu Thr Cys Phe Gly Ser				580
Glu Ala Asp Gln Cys Ala Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Ser Ser Ser Cys Val Ala Arg				600



pcDNA3.1hyg/ECD-PD expresszió



8. ÁBRA (2.sz. szekvencia)

	810	620	
Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Tyr Pro Asp Glu			620
Glu Gly Ile Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Glu			640
Arg Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Val Thr Phe Ile Ile Ala Thr Val Val			660
Gly Val Leu Leu Phe Leu Ile Leu Val Val Val Val Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Arg			680
Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro			700
	710	720	
Leu Thr Pro Ser Gly Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu			720
Leu Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile Trp			740
Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr			760
Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser			780
Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln			800
	810	820	
Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu His Arg Gly Arg Leu Gly Ser			820
Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val			840
Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val			860
Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala			880
Asp Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg Arg Phe			900
	910	920	
Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly			920
Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu			940
Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp			960
Met Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met			980
Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ser Ser Pro			1000
	1010	1020	
Met Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp			1020
Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Ser Pro Asp Pro Thr Pro Gly Thr			1040
Gly Ser Thr Ala His Arg Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly Gly Glu Leu			1060
Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Gly Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu			1080
Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Ala Met Gly Val Thr Lys Gly Leu Gln			1100
	1110	1120	
Ser Leu Ser Pro His Asp Leu Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Leu Pro			1120
Leu Pro Pro Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Ala Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr			1140
Val Asn Gln Ser Glu Val Gln Pro Gln Pro Pro Leu Thr Pro Glu Gly Pro Leu Pro Pro			1160
Val Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly			1180
Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Val Pro			1200
	1210	1220	
Arg Glu Gly Thr Ala Ser Pro Pro His Pro Ser Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp Asn			1220
Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asn Ser Ser Glu Gln Gly Pro Pro Pro Ser Asn Phe Glu Gly			1240
Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro Val . . .			1258

9. ÁBRA (3.sz. szekvencia)

	10	20	
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu Pro Pro Gly Ala			20
Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu			40
Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu			60
Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val			80
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg			100
	110	120	
Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly			120
Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu			140
Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln			160
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala			180
Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys			200
	210	220	
Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys			220
Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys			240
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His			260
Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu			280
Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro			300
	310	320	
Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln			320
Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg			340
Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn			380
Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser			380
Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe			400
	410	420	
Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro			420
Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala			440
Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu			480
Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val			480
Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro			500
	510	520	
Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys			520
Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys			540
Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys			560
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu			580
Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys			600
	610	620	
Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu			620
Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys			640
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser		653	



10. ÁBRA (4.sz. szekvencia)

	10		20	
Gln Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu				20
Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly				40
Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser				60
Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu				80
Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp				100
	110		120	
Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu				120
Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala				140
Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro				160
Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg				180
Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly Gly				200
	210		220	
Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro				220
Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu				240
Arg Gly Ala Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu				260
Gly Leu Asp Val Pro Val				267

11. ÁBRA (5.sz. szekvencia)

	10		20	
Gln Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu				20
Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly				40
Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg				60
.				61



12. ÁBRA (6.sz. szekvencia)

	10	20	
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu Pro Pro Gly Ala			20
Ala Ser Thr Gin Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu			40
Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gly Gly Cys Gin Val Val Gin Gly Asn Leu			60
Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gin Asp Ile Gin Glu Val			80
Gin Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gin Val Arg Gin Val Pro Leu Gin Arg Leu Arg			100
	110	120	
Ile Val Arg Gly Thr Gin Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly			120
Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu			140
Gin Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gin Arg Asn Pro Gin			160
Leu Cys Tyr Gin Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gin Leu Ala			180
Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys			200
	210	220	
Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gin Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys			220
Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gin Cys			240
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His			260
Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu			280
Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro			300
	310	320	
Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gin			320
Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gin Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg			340
Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn			360
Ile Gin Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser			380
Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gin Pro Glu Gin Leu Gin Val Phe			400
	410	420	
Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro			420
Asp Leu Ser Val Phe Gin Asn Leu Gin Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala			440
Tyr Ser Leu Thr Leu Gin Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu			460
Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val			480
Pro Trp Asp Gin Leu Phe Arg Asn Pro His Gin Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro			500
	510	520	
Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gin Leu Cys Ala Arg Gly His Cys			520
Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gin Cys Val Asn Cys Ser Gin Phe Leu Arg Gly Gin Glu Cys			540
Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gin Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys			560
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gin Pro Gin Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu			580
Ala Asp Gin Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys			600



12. ÁBRA (6.sz. szekvencia)

	610		620	
Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu				620
Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys				640
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Gln Asn Glu Asp Leu Gly Pro				660
Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp				680
Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala				700
	710		720	
Pro Gly Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly				720
Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala				740
Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys				760
Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro				780
Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln				800
	810		820	
Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro				820
Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly				840
Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr				860
Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala				880
Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro Pro Ser Thr				900
	910		920	
Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro Val				920



73.078/SZE

13. ÁBRA (7.sz. szekvencia)

	10	20	
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu Pro Pro Gly Ala			20
Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu			40
Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu			60
Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val			80
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg			100
	110	120	
Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly			120
Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Thr Arg Glu Leu			140
Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln			160
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala			180
Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys			200
	210	220	
Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys			220
Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys			240
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His			260
Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu			280
Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro			300
	310	320	
Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln			320
Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg			340
Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn			360
Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser			380
Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe			400
	410	420	
Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro			420
Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala			440
Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu			460
Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val			480
Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro			500
	510	520	
Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys			520
Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys			540
Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys			560
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu			580
Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys			600
	610	620	
Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu			620
Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys			640
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Gln Asn Glu Asp Leu Gly Pro			660
Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp			680
Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala			700
	710	720	
Pro Gly Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg . . .			714



73.078/SZE

14. ÁBRA (8.sz. szekvencia)

	10		20	
Met Glu Leu Ala Ala Trp Cys Arg Trp Gly Phe Leu Leu Ala Leu Leu Pro Pro Gly Ile				20
Ala Gly Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu				40
Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu				60
Glu Leu Thr Tyr Val Pro Ala Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val				80
Gln Gly Tyr Met Leu Ile Ala His Asn Gln Val Lys Arg Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg				100
	110		120	
Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Lys Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Arg				120
Asp Pro Gln Asp Asn Val Ala Ala Ser Thr Pro Gly Arg Thr Pro Glu Gly Leu Arg Glu				140
Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Arg Gly Asn Pro				160
Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Met Val Leu Trp Lys Asp Val Phe Arg Lys Asn Asn Gln Leu				180
Ala Pro Val Asp Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys Pro Pro Cys Ala Pro Ala Cys				200
	210		220	
Lys Asp Asn His Cys Trp Gly Glu Ser Pro Glu Asp Cys Gln Ile Leu Thr Gly Thr Ile				220
Cys Thr Ser Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Arg Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln				240
Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn				260
His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe				280
Glu Ser Met His Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Thr Cys				300
	310		320	
Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Glu Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Pro Asn Asn				320
Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala				340
Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Gly Ala Arg Ala Ile Thr Ser Asp				360
Asn Val Gln Glu Phe Asp Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu				380
Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ser Ser Gly Ile Ala Pro Leu Arg Pro Glu Gln Leu Gln Val				400
	410		420	
Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu				420
Arg Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Arg Ile Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asp Gly				440
Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile His Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg				460
Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His Arg Asn Ala His Leu Cys Phe Val His Thr				480
Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Ser Gly Asn Arg				500
	510		520	
Pro Glu Glu Asp Cys Gly Leu Glu Gly Leu Val Cys Asn Ser Leu Cys Ala His Gly His				520
Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser His Phe Leu Arg Gly Gln Glu				540
Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Trp Lys Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Ser Asp Lys Arg				560
Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Ser Ser Glu Thr Cys Phe Gly Ser				580
Glu Ala Asp Gln Cys Ala Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Ser Ser Ser Cys Val Ala Arg				600
	610		620	
Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Tyr Pro Asp Glu				620
Glu Gly Ile Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Glu				640
Arg Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Val Thr Phe				654



15. ÁBRA (9.sz. szekvencia)

ATG	GAG	CTG	GCG	GCC	TTG	TGC	CGC	TGG	GGG	CTC	CTC	CTC	GCC	CTC	TTG	48
Met	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Cys	Arg	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	
1				5					10					15		
CCC	CCC	GGA	GCC	GCG	AGC	ACC	CAA	GTG	TGC	ACC	GGC	ACA	GAC	ATG	AAG	96
Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys	
		20						25					30			
CTG	CGG	CTC	CCT	GCC	AGT	CCC	GAG	ACC	CAC	CTG	GAC	ATG	CTC	CGC	CAC	144
Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	His	
		35					40					45				
CTC	TAC	CAG	GGC	TGC	CAG	GTG	GTG	CAG	GGA	AAC	CTG	GAA	CTC	ACC	TAC	192
Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Thr	Tyr	
	50					55					60					
CTG	CCC	ACC	AAT	GCC	AGC	CTG	TCC	TTC	CTG	CAG	GAT	ATC	CAG	GAG	GTG	240
Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val	
65					70					75					80	
CAG	GGC	TAC	GTG	CTC	ATC	GCT	CAC	AAC	CAA	GTG	AGG	CAG	GTC	CCA	CTG	288
Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu	
				85					90					95		
CAG	AGG	CTG	CGG	ATT	GTG	CGA	GGC	ACC	CAG	CTC	TTT	GAG	GAC	AAC	TAT	336
Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr	
			100					105						110		
GCC	CTG	GCC	GTG	CTA	GAC	AAT	GGA	GAC	CCG	CTG	AAC	AAT	ACC	ACC	CCT	384
Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro	
			115					120							125	



73.078/SZE

15. ÁBRA (9.sz. szekvencia)

GTC ACA GGG GCC TCC CCA GGA GGC CTG CGG GAG CTG CAG CTT CGA AGC Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser 130 135 140	432
CTC ACA GAG ATC TTG AAA GGA GGG GTC TTG ATC CAG CGG AAC CCC CAG Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln 145 150 155 160	480
CTC TGC TAC CAG GAC ACG ATT TTG TGG AAG GAC ATC TTC CAC AAG AAC Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn 165 170 175	528
AAC CAG CTG GCT CTC ACA CTG ATA GAC ACC AAC CGC TCT CGG GCC TGC Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys 180 185 190	576
CAC CCC TGT TCT CCG ATG TGT AAG GGC TCC CGC TGC TGG GGA GAG AGT His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser 195 200 205	624
TCT GAG GAT TGT CAG AGC CTG ACG CGC ACT GTC TGT GCC GGT GGC TGT Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys 210 215 220	672
GCC CGC TGC AAG GGG CCA CTG CCC ACT GAC TGC TGC CAT GAG CAG TGT Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys 225 230 235 240	720
GCT GCC GGC TGC ACG GGC CCC AAG CAC TCT GAC TGC CTG GCC TGC CTC Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu 245 250 255	768
CAC TTC AAC CAC AGT GGC ATC TGT GAG CTG CAC TGC CCA GCC CTG GTC His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val 260 265 270	816
ACC TAC AAC ACA GAC ACG TTT GAG TCC ATG CCC AAT CCC GAG GGC CGG Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg 275 280 285	864
TAT ACA TTC GGC GCC AGC TGT GTG ACT GCC TGT CCC TAC AAC TAC CTT Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu 290 295 300	912



73.078/SZE

15. ÁBRA (9.sz. szekvencia)

TCT ACG GAC GTG GGA TCC TGC ACC CTC GTC TGC CCC CTG CAC AAC CAA Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln 305 310 315 320	960
GAG GTG ACA GCA GAG GAT GGA ACA CAG CGG TGT GAG AAG TGC AGC AAG Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys 325 330 335	1008
CCC TGT GCC CGA GTG TGC TAT GGT CTG GGC ATG GAG CAC TTG CGA GAG Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu 340 345 350	1056
GTG AGG GCA GTT ACC AGT GCC AAT ATC CAG GAG TTT GCT GGC TGC AAG Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys 355 360 365	1104
AAG ATC TTT GGG AGC CTG GCA TTT CTG CCG GAG AGC TTT GAT GGG GAC Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp 370 375 380	1152
CCA GCC TCC AAC ACT GCC CCG CTC CAG CCA GAG CAG CTC CAA GTG TTT Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe 385 390 395 400	1200
GAG ACT CTG GAA GAG ATC ACA GGT TAC CTA TAC ATC TCA GCA TGG CCG Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro 405 410 415	1248
GAC AGC CTG CCT GAC CTC AGC GTC TTC CAG AAC CTG CAA GTA ATC CGG Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg 420 425 430	1296
GGA CGA ATT CTG CAC AAT GGC GCC TAC TCG CTG ACC CTG CAA GGG CTG Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu 435 440 445	1344
GGC ATC AGC TGG CTG GGG CTG CGC TCA CTG AGG GAA CTG GGC AGT GGA Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly 450 455 460	1392
CTG GCC CTC ATC CAC CAT AAC ACC CAC CTC TGC TTC GTG CAC ACG GTG Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val 465 470 475 480	1440



73.078/SZE

15. ÁBRA (9.sz. szekvencia)

CCC TGG GAC CAG CTC TTT CGG AAC CCG CAC CAA GCT CTG CTC CAC ACT	1488
Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr	
485 490 495	
GCC AAC CGG CCA GAG GAC GAG TGT GTG GGC GAG GGC CTG GCC TGC CAC	1536
Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His	
500 505 510	
CAG CTG TGC GCC CGA GGG CAC TGC TGG GGT CCA GGG CCC ACC CAG TGT	1584
Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys	
515 520 525	
GTC AAC TGC AGC CAG TTC CTT CGG GGC CAG GAG TGC GTG GAG GAA TGC	1632
Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys	
530 535 540	
CGA GTA CTG CAG GGG CTC CCC AGG GAG TAT GTG AAT GCC AGG CAC TGT	1680
Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys	
545 550 555 560	
TTG CCG TGC CAC CCT GAG TGT CAG CCC CAG AAT GGC TCA GTG ACC TGT	1728
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys	
565 570 575	
TTT GGA CCG GAG GCT GAC CAG TGT GTG GCC TGT GCC CAC TAT AAG GAC	1776
Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp	
580 585 590	
CCT CCC TTC TGC GTG GCC CGC TGC CCC AGC GGT GTG AAA CCT GAC CTC	1824
Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu	
595 600 605	
TCC TAC ATG CCC ATC TGG AAG TTT CCA GAT GAG GAG GGC GCA TGC CAG	1872
Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln	
610 615 620	
CCT TGC CCC ATC AAC TGC ACC CAC TCC TGT GTG GAC CTG GAT GAC AAG	1920
Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys	
625 630 635 640	
GGC TGC CCC GCC GAG CAG AGA GCC AGC CCT CTG ACG TCC ATC ATC TCT	1968
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser	
645 650 655	
GCG GTG GTT GGC ATT CTG CTG GTC GTG GTC TTG GGG GTG GTC TTT GGG	2016
Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly	
660 665 670	

73.078/SZE

15. ÁBRA (9.sz. szekvencia)

ATC	CTC	ATC	AAG	CGA	CGG	CAG	CAG	AAG	ATC	CGG	AAG	TAC	ACG	ATG	CGG	2064
Ile	Leu	Ile	Lys	Arg	Arg	Gln	Gln	Lys	Ile	Arg	Lys	Tyr	Thr	Met	Arg	
		675						680							685	
AGA	CTG	CTG	CAG	GAA	ACG	GAG	CTG	GTG	GAG	CCG	CTG	ACA	CCT	AGC	GGA	2112
Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Thr	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	
		690						695							700	
GCG	ATG	CCC	AAC	CAG	GCG	CAG	ATG	CGG	ATC	CTG	AAA	GAG	ACG	GAG	CTG	2160
Ala	Met	Pro	Asn	Gln	Ala	Gln	Met	Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr	Glu	Leu	
		705						710							720	
AGG	AAG	GTG	AAG	GTG	CTT	GGA	TCT	GGC	GCT	TTT	GGC	ACA	GTC	TAC	AAG	2208
Arg	Lys	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr	Lys	
						725									735	
GGC	ATC	TGG	ATC	CCT	GAT	GGG	GAG	AAT	GTG	AAA	ATT	CCA	GTG	GCC	ATC	2256
Gly	Ile	Trp	Ile	Pro	Asp	Gly	Glu	Asn	Val	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Ile	
						740									750	
AAA	GTG	TTG	AGG	GAA	AAC	ACA	TCC	CCC	AAA	GCC	AAC	AAA	GAA	ATC	TTA	2304
Lys	Val	Leu	Arg	Glu	Asn	Thr	Ser	Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu	
															765	
GAC	GAA	GCA	TAC	GTG	ATG	GCT	GGT	GTG	GGC	TCC	CCA	TAT	GTC	TCC	CGC	2352
Asp	Glu	Ala	Tyr	Val	Met	Ala	Gly	Val	Gly	Ser	Pro	Tyr	Val	Ser	Arg	
															780	
CTT	CTG	GGC	ATC	TGC	CTG	ACA	TCC	ACG	GTG	CAG	CTG	GTG	ACA	CAG	CTT	2400
Leu	Leu	Gly	Ile	Cys	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Leu	Val	Thr	Gln	Leu	
															800	
ATG	CCC	TAT	GGC	TGC	CTC	TTA	GAC	CAT	GTC	CGG	GAA	AAC	CGC	GGA	CGC	2448
Met	Pro	Tyr	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp	His	Val	Arg	Glu	Asn	Arg	Gly	Arg	
															815	
CTG	GGC	TCC	CAG	GAC	CTG	CTG	AAC	TGG	TGT	ATG	CAG	ATT	GCC	AAG	GGG	2496
Leu	Gly	Ser	Gln	Asp	Leu	Leu	Asn	Trp	Cys	Met	Gln	Ile	Ala	Lys	Gly	
															830	
ATG	AGC	TAC	CTG	GAG	GAT	GTG	CGG	CTC	GTA	CAC	AGG	GAC	TTG	GCC	GCT	2544
Met	Ser	Tyr	Leu	Glu	Asp	Val	Arg	Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	
															845	



73.078/SZE

15. ÁBRA (9.sz. szekvencia)

CGG AAC GTG CTG GTC AAG AGT CCC AAC CAT GTC AAA ATT ACA GAC TTC Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe 850 855 860	2592
GGG CTG GCT CGG CTG CTG GAC ATT GAC GAG ACA GAG TAC CAT GCA GAT Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp 865 870 875 880	2640
GGG GGC AAG GTG CCC ATC AAG TGG ATG GCG CTG GAG TCC ATT CTC CGC Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg 885 890 895	2688
CGG CGG TTC ACC CAC CAG AGT GAT GTG TGG AGT TAT GGT GTG ACT GTG Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val 900 905 910	2736
TGG GAG CTG ATG ACT TTT GGG GCC AAA CCT TAC GAT GGG ATC CCA GCC Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala 915 920 925	2784
CGG GAG ATC CCT GAC CTG CTG GAA AAG GGG GAG CGG CTG CCC CAG CCC Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro 930 935 940	2832
CCC ATC TGC ACC ATT GAT GTC TAC ATG ATC ATG GTC AAA TGT TGG ATG Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met 945 950 955 960	2880
ATT GAC TCT GAA TGT CGG CCA AGA TTC CGG GAG TTG GTG TCT GAA TTC Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe 965 970 975	2928
TCC CGC ATG GCC AGG GAC CCC CAG CGC TTT GTG GTC ATC CAG AAT GAG Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu 980 985 990	2976
GAC TTG GGC CCA GCC AGT CCC TTG GAC AGC ACC TTC TAC CGC TCA CTG Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu 995 1000 1005	3024
CTG GAG GAC GAT GAC ATG GGG GAC CTG GTG GAT GCT GAG GAG TAT CTG Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu 1010 1015 1020	3072



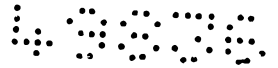
73.078/SZE

15. ÁBRA (9.sz. szekvencia)

GTA CCC CAG CAG GGC TTC TTC TGT CCA GAC CCT GCC CCG GGC GCT GGG Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly 1025 1030 1035 1040	3120
GGC ATG GTC CAC CAC AGG CAC CGC AGC TCA TCT ACC AGG AGT GGC GGT Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly 1045 1050 1055	3168
GGG GAC CTG ACA CTA GGG CTG GAG CCC TCT GAA GAG GAG GCC CCC AGG Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg 1060 1065 1070	3216
TCT CCA CTG GCA CCC TCC GAA GGG GCT GGC TCC GAT GTA TTT GAT GGT Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly 1075 1080 1085	3264
GAC CTG GGA ATG GGG GCA GCC AAG GGG CTG CAA AGC CTC CCC ACA CAT Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His 1090 1095 1100	3312
GAC CCC AGC CCT CTA CAG CGG TAC AGT GAG GAC CCC ACA GTA CCC CTG Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu 1105 1110 1115 1120	3360
CCC TCT GAG ACT GAT GGC TAC GTT GCC CCC CTG ACC TGC AGC CCC CAG Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln 1125 1130 1135	3408
CCT GAA TAT GTG AAC CAG CCA GAT GTT CGG CCC CAG CCC CCT TCG CCC Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro 1140 1145 1150	3456
CGA GAG GGC CCT CTG CCT GCT GCC CGA CCT GCT GGT GCC ACT CTG GAA Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu 1155 1160 1165	3504
AGG CCC AAG ACT CTC TCC CCA GGG AAG AAT GGG GTC GTC AAA GAC GTT Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val 1170 1175 1180	3552
TTT GCC TTT GGG GGT GCC GTG GAG AAC CCC GAG TAC TTG ACA CCC CAG Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln 1185 1190 1195 1200	3600

15. ÁBRA (9.sz. szekvencia)

GGA GGA GCT GCC CCT CAG CCC CAC CCT CCT CCT GCC TTC AGC CCA GCC Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala 1205 1210 1215	3648
TTC GAC AAC CTC TAT TAC TGG GAC CAG GAC CCA CCA GAG CGG GGG GCT Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala 1220 1225 1230	3696
CCA CCC AGC ACC TTC AAA GGG ACA CCT ACG GCA GAG AAC CCA GAG TAC Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr 1235 1240 1245	3744
CTG GGT CTG GAC GTG CCA GTG TGA Leu Gly Leu Asp Val Pro Val 1250 1255	3768

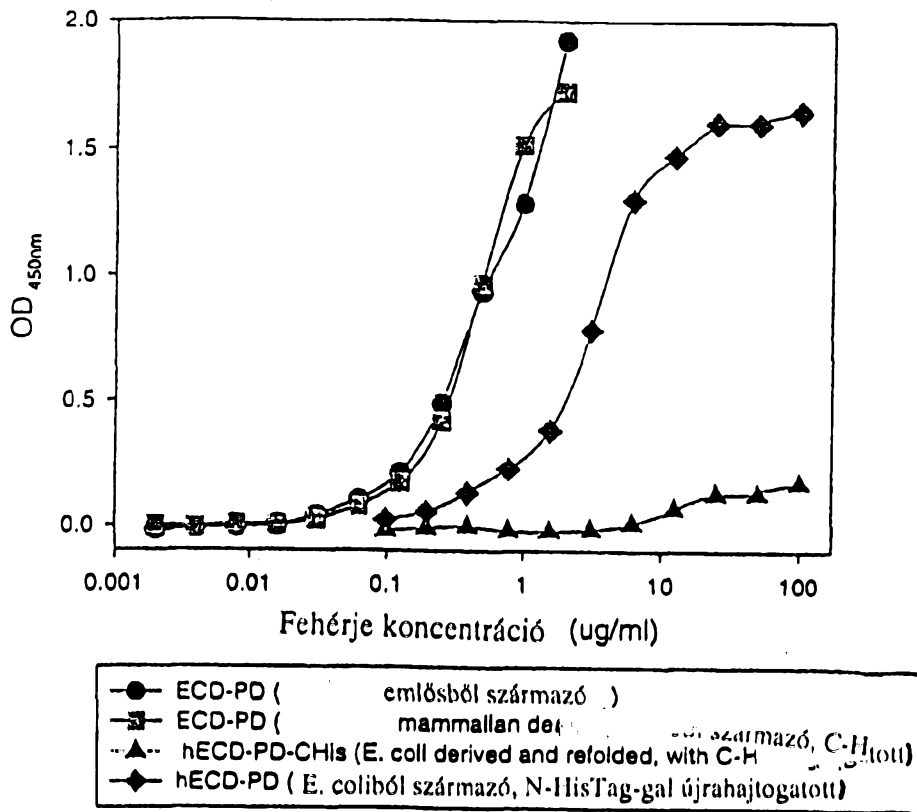


73.078/SZE

Fig. 16 (SEQ ID NO: 10)

2401 GGCCTTCACT ATACAGGCTG CACGCGAGCT CACTGCGCTAC GGCCTGCTTC TGGAGCATGT
2402 GCGGAGAAAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2403 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2404 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2405 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2406 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2407 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2408 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2409 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2410 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2411 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2412 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2413 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2414 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2415 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2416 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2417 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2418 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2419 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC
2420 GAGGAGAGAG AGGATCTGCT CAGGCTGAGG GATCTTGGCT AACCGGTTTG CTCAGGCTGC

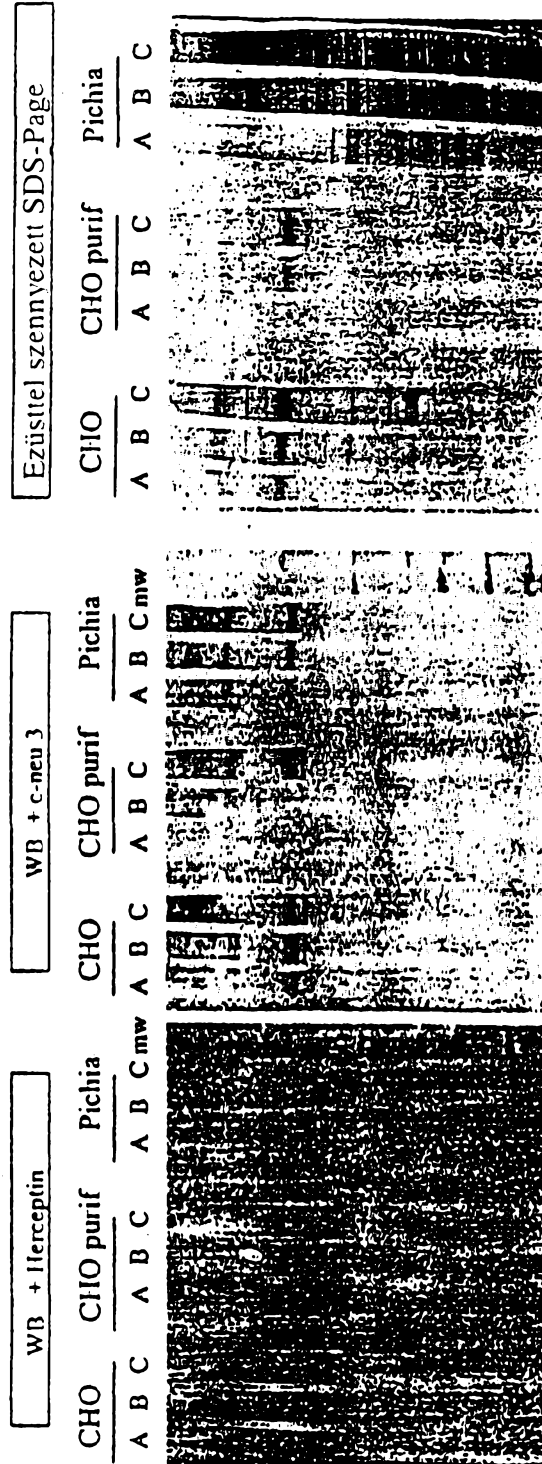
Herceptin kötés, Direct Elisa módszerrel mérve (10/5/99)



17. ÁBRA

18. ÁBRA

CHO-K1 (S/SF) és Pichia esetén mérhető Her2neu ECD-PD expresszió összehasonlítása (nem redukzív körülmények között)



CHO; A, B, C = 2,5 µl/ 5 µl/ 10 µl

CHO purif; A, B, C = 125 ng/ 250 ng/ 500 ng

Pichia; A, B, C = 2,5 µl/ 5 µl/ 10 µl (OD 120, 1/30-as hígítás)





73.078/SZE

19. ÁBRA (11.sz. szekvencia)

ctgcccccg	agactgatgg	ctacgttget	ccccctggcct	gcagccccca	gcccagatg	3420
gtgaaccagc	cagagggttcg	gcctcagtct	cccttgacct	cagagggtcc	tccgcctccc	3480
atccgacctg	ctggtgctac	tctagaaaga	ccaagactc	tctctcctgg	gaaaaatggg	3540
gttgtcaaag	acgtttttgc	ctttgggggt	gctgtggaga	accctgaata	cctagcacc	3600
agagcaggca	ctgcctctca	gccccacct	tctcctgcct	tcagcccagc	ctttgacaac	3660
ctctattact	gggaccagaa	ctcatcggag	cagggtcctc	caccaagtac	ctttgaaggg	3720
acccccactg	cagagaacct	tgagtaccta	ggcctggatg	tgccagtatg	a	3771



20. ÁBRA (14.sz. szekvencia)

Met Glu Leu Ala Ala Trp Cys Arg Trp Gly Phe Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Pro Gly Ala Ala Gly Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 20 25 30
 Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35 40 45
 Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50 55 60
 Leu Pro Ala Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65 70 75 80
 Gln Gly Tyr Met Leu Ile Ala His Asn Arg Val Lys His Val Pro Leu
 85 90 95
 Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Lys Tyr
 100 105 110
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Arg Asp Pro Leu Asp Asn Val Thr Thr
 115 120 125
 Ala Ala Pro Gly Arg Thr Pro Glu Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg
 130 135 140
 Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Arg Gly Asn Pro
 145 150 155 160
 Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Met Val Leu Trp Lys Asp Val Leu Arg Lys
 165 170 175
 Asn Asn Gln Leu Ala Pro Val Asp Met Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala
 180 185 190
 Cys Pro Pro Cys Ala Pro Thr Cys Lys Asp Asn His Cys Trp Gly Glu
 195 200 205
 Ser Pro Glu Asp Cys Gln Ile Leu Thr Gly Thr Ile Cys Thr Ser Gly
 210 215 220
 Cys Ala Arg Cys Lys Gly Arg Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln
 225 230 235 240
 Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys
 245 250 255
 Leu His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu
 260 265 270
 Ile Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Leu Asn Pro Glu Gly
 275 280 285
 Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Thr Cys Pro Tyr Asn Tyr
 290 295 300
 Leu Ser Thr Glu Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Pro Asn Asn
 305 310 315 320
 Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser
 325 330 335
 Lys Pro Cys Ala Gly Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg
 340 345 350
 Gly Ala Arg Ala Ile Thr Ser Asp Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys
 355 360 365
 Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly
 370 375 380
 Asn Pro Ser Ser Gly Val Ala Pro Leu Lys Pro Glu His Leu Gln Val
 385 390 395 400
 Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp
 405 410 415
 Pro Glu Ser Phe Gln Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Arg Val Ile



20. ÁBRA (14.sz. szekvencia)

Asp Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu
 885 890 895
 Arg Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr
 900 905 910
 Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro
 915 920 925
 Ala Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln
 930 935 940
 Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp
 945 950 955 960
 Met Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu
 965 970 975
 Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn
 980 985 990
 Glu Asp Leu Gly Pro Ser Ser Pro Met Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser
 995 1000 1005
 Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Glu Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
 1010 1015 1020
 Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Ser Pro Asp Pro Ala Leu Gly Thr
 1025 1030 1035 1040
 Gly Ser Thr Ala His Arg Arg His Arg Ser Ser Ser Ala Arg Ser Gly
 1045 1050 1055
 Gly Gly Glu Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Pro Pro
 1060 1065 1070
 Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp
 1075 1080 1085
 Gly Asp Leu Ala Val Gly Val Thr Lys Gly Leu Gln Ser Leu Ser Pro
 1090 1095 1100
 His Asp Leu Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Leu Pro
 1105 1110 1115 1120
 Leu Pro Pro Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Ala Cys Ser Pro
 1125 1130 1135
 Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Glu Val Arg Pro Gln Ser Pro Leu
 1140 1145 1150
 Thr Pro Glu Gly Pro Pro Pro Pro Ile Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu
 1155 1160 1165
 Glu Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp
 1170 1175 1180
 Val Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Ala Pro
 1185 1190 1195 1200
 Arg Ala Gly Thr Ala Ser Gln Pro His Pro Ser Pro Ala Phe Ser Pro
 1205 1210 1215
 Ala Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asn Ser Ser Glu Gln Gly
 1220 1225 1230
 Pro Pro Pro Ser Thr Phe Glu Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu
 1235 1240 1245
 Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255