

P9601908

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

75551

T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjék és eljárások előállításukra

KIVONAT

A találmány tárgyát teljes hosszúságú rekombináns T-sejt-receptor (TCR) V-régió-fehérjék képezik, valamint expressziós vektorok, melyek alkalmasak rekombináns T-sejt-receptor-V-régió-fehérjék előállítására gazdaságilag hasznosítható mennyiségben, valamint eljárások teljes hosszúságú rekombináns T-sejt-receptor-V-régió-fehérjék alkalmazására az immunrendszer rendellenességeinek és betegségeinek diagnózisában és kezelésében.

Földes

P9601908

3740

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA Kft.

T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjék és eljárások előállításukra

A találmány szerinti megoldás tágabb értelemben az immunológia és az orvostudomány tárgykörébe tartozik. A találmány tárgyát közelebbről teljes hosszúságú rekombináns T-sejt-receptor (TCR) V-régió-fehérjék képezik, valamint expressziós vektorok, melyek alkalmasak rekombináns T-sejt-receptor-V-régió-fehérjék előállítására gazdaságilag hasznosítható mennyiségben, valamint eljárások teljes hosszúságú rekombináns T-sejt-receptor-V-régió-fehérjék alkalmazására az immunrendszer rendellenességeinek és betegségeinek diagnózisában és kezelésében.

A fentiek értelmében a találmány szerinti megoldás előnyösen alkalmazható immunrendszeri rendellenességek diagnosztizálására és kezelésére.

Az idegen eredetű antigénekre adott immunválasz B-sejtek által közvetített humorális, és T-sejtek által közvetített sejtes immunválaszra osztható. A receptormolekulák, melyeket a B-sejtek használnak antigén felismerésre, a globuláris fehérjék konformációs epitópjait felismerő immunglobulinok. A T-sejtek antigénreceptorai szintén rokonságban vannak az immunglobulinokkal, azonban csak saját fő hisztokompatibilitási komplexhez (MHC) kötött

Aktaszámunk: 84107-7215B/PÁ

feldolgozott antigén molekulákat kötnek meg [Dembic és mtsai., Immunol. Today, 7, 308 (1986)].

A TCR-gének az immunoglobulin génekhez hasonlóan kódoló régiókból (vagy génszegmensekből) állnak, melyek a T-sejt fejlődése során átrendeződnek [Chien és mtsai., Nature, 312, 31-35 (1984); Hedrick és mtsai., Nature, 308, 149-143 (1984); Yanagi és mtsai., Nature, 308, 145-149 (1984)]. Az emberi T-sejt-receptor β -láncának lókusztát kiterjedten tanulmányozták azóta, hogy a β -láncot kódoló első cDNS-t klónozták. [Yanagi és mtsai., Nature, 308, 145-149 (1984); Hedrick és mtsai., Nature, 308, 149-143 (1984); Siu és mtsai., Cell, 37, 393-401 (1984)]. Ez a lókuszt egy génkomplex, amely a β -lánc ismert régióit (vagy doménjeit) kódoló régiókból áll: a variábilis (V), a diverzitási (D), és a kapcsoló ("joining", J) doménekből. Ezek a kódoló régiók vesznek részt a szomatikus sejtek átrendeződésében a konstans (C) domént kódoló régióval együtt [Chien és mtsai., Nature, 309, 322-326 (1984)]. *In situ* vizsgálatok a TCR β -lókusztának helyét a 7. kromoszómán, 7q35-nél azonosították. [Isobe és mtsai., Science, 228, 580 (1985)]. Jelenlegi becslések szerint ez a komplex több mint 600 kb hosszú, és 70 vagy 80 variábilis (V) régió szegmenst tartalmaz. [Concannon és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6598-6602 (1986); Tillinghast és mtsai., Science, 233, 879-883 (1986), Kimura és mtsai., Eur. J. Immunol., 17, 375-383 (1987); Lai és mtsai., Nature, 331, 543-546 (1988)]. Ezek a V-régió-génszegmensek szomszédosak két együttesen szerveződő régióval, melyek mindegyikében egy D és egy C génszeg-

mens van, melyeket hat vagy hét J-régió-génszegmens csoportja követ. [Tunnacliffe és mtsai., *Nucleic Acid Research*, 13, 6651-6661 (1985); Toyonaga és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 8624-8628 (1985)]. A V, D, és a J kódoló régiók (gén szegmensek) sikeres DNS átrendeződése után a transzlálódott β -lánc a TCR α -láncához kapcsolódik, és a T-sejt felszínére kerülhet [Kronenberg és mtsai., *Ann. Rev. Immunol.*, 4, 529-591 (1986)].

Az emberi 14. kromoszómán a TCR-gén α - és δ -lókusza egymással közvetlenül szomszédosak, sőt, a TCR δ kódoló régiói teljes mértékben az α -gén lókuszában belül foglalnak helyet. [Satyanarayana és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8166-8170 (1988); Chien és mtsai. *Nature*, 330, 722-727 (1987); Elliott és mtsai., *Nature*, 331, 627-631 (1988)]. Legalább 45-50 $V\alpha$ kódoló régió meglétét becsülték [Becker és mtsai., *Nature*, 317, 430-434 (1985)], holott $V\delta$ kódoló régióból csupán 10 van jelen a lókuszon [Chien és mtsai., (1987), ld. fent]. A perifériás vérben úgy tűnik, két $V\delta$ kódoló régió fejeződik ki jelentősebb mennyiségben, a $V\delta 1$ és a $V\delta 2$.

A γ -TCR-gént először egérben azonosították [Saito és mtsai., *Nature*, 309, 752-762 (1984); Kranz és mtsai., *Nature*, 313, 762, (1985); Hayday és mtsai., *Cell*, 40, 259-269 (1985)], majd később emberben is [Lefranc és mtsai., *Nature*, 316, 464-466 (1985); Murre és mtsai., *Nature*, 316, 549-552 (1985)]. Az emberi TCR- γ -lókuszt úgy tűnik öt és tíz közötti V, öt J és két C kódoló régióból áll [Dialynas és mtsai., *Proc. Natl., Acad. Sci. USA*, 83, 2619 (1986)].

A TCR-gén változatossága (más szóval: diverzitása), és az ebből fakadó T-sejt specifitás több okra vezethető vissza [Barth és mtsai., Nature, 316, 517-523 (1985); Fink és mtsai., Nature, 321, 219-225, (1986)]. Ilyen pl. az embriónális ("germline") génszegmensek multiplicitása [Chien és mtsai., Nature, 309, 322-326 (1984); Malissen és mtsai., Cell, 37, 1101-1110 (1984); Gascione és mtsai., Nature, 310, 387-391 (1984); Kavalier és mtsai., Nature, 310, 421-423 (1984); Siu és mtsai., Nature, 311, 344-349 (1984); Patten és mtsai., Nature, 312, 40-46 (1984)], a különböző V, D és J kódoló régiók egyesülésén keresztül érvényre jutó kombinációs változatosság [Siu és mtsai., Cell, 37, 393-401 (1984); Goverman és mtsai., Cell, 40, 859-867 (1985)], a kapcsolódási flexibilitás, N-terminális régió változatossága, több D-régió egyidejű használata, vagy az, hogy a D β szegmensek esetén a három transzlációs leolvasási keret közül bármelyik alkalmazható. Úgy tűnik, a TCR változatossága nem az - immunoglobulinoknál megfigyelt [Barth és mtsai., mint fent] - szomatikus hipermutációs mechanizmusból ered. A fenti mechanizmusok eredményeképpen olyan TCR-ek keletkeznek, amelyek különböznek amino-terminális (vagy másképp: N-terminális) régiójukban és doménjeikben (vagyis a V, D és J-régió különböző kombinációiból készültek), de egyébként hasonlóak, beleértve a karboxi-terminális (vagy C-terminális) doméneket (amelyeket a TCR-ek konstans régiói építenek fel). A TCR-molekulák tehát rendkívül nagy változatosságban keletkeznek.

Az emberi TCR β -láncának variábilis kódoló régiói szerkezetének és változatosságának a tanulmányozása oda vezetett, hogy ezeket a régiókat különböző V-régióalcsaládokra osztották. [Tillinghast és mtsai., *Science*, 233, 879-883 (1986); Concannon és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 6598-6602 (1986); Borst és mtsai., *J. Immunol.*, 139, 1952-1959 (1987)]. Mindegyik V-régióalcsalád egy konszenzus szekvenciával jellemezhető, és hasonló kódoló régiókat tartalmaz, melyek nagyobb, mint 75%-os hasonlóságot mutatnak DNS szinten. Tizenhat egér $V\beta$ szekvenciát például 14 különböző alcsaládba osztottak, egy tetszőleges, de egyszerű numerikus nomenklatúrát javasolva a $V\beta$ szegmensekre [Barth és mtsai.: "The Murine T Cell Receptor Employes a Limited Repertoire of Expressed $V\beta$ Gene Segments", *Nature*, 316, 517-523 (1985)]. Eszerint a nomenklatúra szerint ugyanazon alcsalád tagjai esetén az első számjegy közös, míg a második különböző, így tehát a $V\beta 8.1$, a $V\beta 8.2$ és a $V\beta 8.3$ mind ugyanazon $V\beta 8$ alcsalád tagjai. Hasonló rendszert javasoltak az emberi kódoló régiók számára is. A megközelítőleg 60 emberi funkcionális $V\beta$ kódoló régiót legalább 24 családba sorolták be [Toyonaga és Mak, *Ann. Rev. Immunol.* 5, 585 (1988), Wilson és mtsai., *Immunol. Rev.*, 101, 149 (1988); és Robinson, M. A., *J. Immunol.* 146, 4392 (1991)].

A T-sejtek központi szerepet játszanak az immunrendszer effektor mechanizmusainak szabályozásában és differenciálódásában [Paul és mtsai., *Science*, 195, 1293-1300 (1987)]. Az antigén és a fő hisztokompatibilitási komplex

együttes felismerésének specifikusnak és pontosan szabályozottnak kell lennie, mivel a nem tökéletes szabályzás autoimmunitást idézhet elő. Jónéhány laboratórium vizsgált már olyan betegségeket, amelyekben az immunszabályzás tökéletlennek tűnik, mint például az autoimmunitás és az immunhiány bizonyos formái, és úgy találták, hogy a betegségek patogenezisében T-sejtek is szerepet kapnak.

Jónéhány nem kívánt immunválaszt egy bizonyos TCR-összetétel klonális, vagy oligoklonális expanziója jellemmez, olyan malignanciák esetén például, melyek T-sejt leukémiát vagy limfómát eredményeznek [Pl. Jack és mtsai., *Am. J. Pathol.* 136, 17 (1990); Nitta és mtsai., *Science*, 249, 672 (1990); Yoshino és mtsai., *Int. J. Cancer*, 47, 654 (1990)]. A T-sejt leukémiákban vagy a limfómákban a TCR egyedülálló tumor markerként működik, mivel stabilan átrendeződik és a sejt felszínén prezentálódik. Egy meghatározott TCR-összetétel szintén jellemző egy szervátültetés befogadjára. A befogadó T-limfocitáinak TCR-je reagálni tud a donor személy MHC antigénjeivel, például csontvelőátültetés donorjáéival.

Számos csoport hírt adott szelektív TCR-V-régió-expresszióról egyes autoimmun esetekben. Grunwald és mtsai. pl. a V α 2.3 géntermék preferált expresszióját írták le CD4+-T-sejtekben, melyeket bronchoalveolaris váladékból nyertek, összehasonlítva sarkoidosisban szenvedő betegek perifériás vérének limfocitáival [Grunwald és mtsai., *Eur. J. Immunol.*, 22, 129 (1992)]. Kawasaki-kórban V β 2 és V β 8 T-sejtek a betegség kezdetén történő preferált expanzióját

jegyezték le [Abe, J., és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4066, (1992)].

A reumás ízületi gyulladást (RA) kiterjedten tanulmányozták ebben az összefüggésben. Jónéhány kutató megállapította bizonyos T-sejt alcsoportok preferált expanszióját [ld pl. DerSimonian és mtsai., J. Exp. Med., 177, 1623 (1993) (V α 12.1-hordozó T-sejtek preferált expansziója a CD8+ perifériás vér T-limfociták között.); Stamenkovic és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 1179 (1988) (szinoviális membránon infiltrálódó T-limfociták IL-2 jelenlétében tenyésztve oligoklonálisnak bizonyultak Southern-blot analízissel vizsgálva); Paliard és mtsai., Science, 253, 325 (1991) (feltételezik, hogy a szuperantigén-aktivált V β 14 T-sejtek, az autoreaktív T-sejteket is beleértve klonálisan expandálnak, és az RA betegek szinoviális folyadékába vándorolnak); Howell és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 10921 (1991) (RA betegek szinoviális folyadékából származó IL-2R3+ sejtekben a V β 3, V β 14, és V β 17 T-sejt V-régiók preferált használatáról adnak hírt); Uematsu és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8534 (1991) (Egyetlen RA-ban szenvedő személy szinoviális folyadékának T-sejtjeiben oligoklonális T-sejt V-régió gének használata); WO 90/06758-os számú nemzetközi közzétételi irat (A V β 3-nak, V β 9-nek, és V β 10-nek is szerepe van RA-ban)].

A bélgyulladást szintén kiterjedten tanulmányozták. Jónéhány csoport jelzett expandált T-sejt populációt, vagy TCR-V-régió-gének preferált használatát [Posnett és mtsai.,

J. Clin. Invest., 85, 1770 (1990); Spencer és mtsai., J. Clin. Pathol. 44, 915 (1990); Trejdisiewicz és mtsai., Clin. Exp. Immunol., 84, 440 (1991); Van Kerckhove és mtsai., J. Exp. Med., 175, 57 (1992)]. Rajtuk kívül mások is adtak hírt TCR-gén preferált használatáról *Mycobacterium lepraeben* [van Shooten és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 11244 (1992); Wang és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 188 (1993)].

A szklerózis multiplex (MS) autoimmun betegség, melyet a központi idegrendszer egymagvú sejtjeinek infiltrációja (beszűrődése) és mielinburkának lebomlása jellemez. Bár az MS patogenezise ismeretlen, mind genetikai, mind környezeti tényezők szerepet játszanak a betegség folyamatában. A genetikai hajlam fő elemei között szerepel a kór kapcsolata a II. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) haplotípusokkal [Terasaid és mtsai., Science, 193, 1245-1247 (1976); Ho és mtsai., Immunogenetics, 15, 509-517 (1982); Spielman és mtsai., Epidemal. Rev., 4, 45-65 (1982); Francis és mtsai., Lancet, 1, 211 (1986); Elian és mtsai., Disease Markers 5, 89-99 (1987); Urban és mtsai., Cell, 54, 577-592 (1988); Vanderbark és mtsai., Nature, 341, 541-544 (1989); Howell és mtsai., Science, 246 668-670 (1989)].

Kimutatták, hogy az MS-ben szenvedő betegek cerebroszpinális folyadékából izolált T-sejtek a TCR V-régiója génjeinek csökkentett készletét használják. Annak demonstrálása, hogy az MS betegekben *in vivo* aktivált mielin bázikus fehérjével (MBP-vel) reagálni képes T-sejtek

vannak, arra utal, hogy az MBP-reaktív T-sejtek szerepet játszanak a betegség patogenezisében [Wucherpfennig és mtsai., *Science*, 248, 1016-1019 (1990)]. Polimeráz-láncreakció (PCR) segítségével TCR-V β -primerekkel amplifikálták a cDNS-t, és ezek a kísérletek jelezték, hogy az MBP-reaktív T-sejtvonalak csupán korlátozott számú V β kódoló régiót használnak [Wucherpfennig, K. W., és mtsai., *mint fent*, (1990) (A V β 17, - és kisebb mértékben a V β 12 - gyakran használt régiók az emberi MBP-autoantigén immundomináns régiójának felismerésében); Oksenberg, J. R., és mtsai., *Nature*, 362, 68-70 (1993) (Átrendezett V β 5.2- és/vagy V5.3-géneket detektáltak bizonyos HLA-fenotípusú betegek agyában); Kotzin, B.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9161-9165 (1991) (MS-ben szenvedő betegekből származó MBP-specifikus klónok hajlamot mutattak a V β 5.2/5.3, és kisebb mértékben a V β 6.1 használatára)]. Néhány vizsgálat eredményei között az is szerepel, hogy az MS által sérült agyokban korlátozott TCR-V α -génexpressziót találtak [Oksenberg, J. R., és mtsai., *Nature*, 345, 344-346 (1990)].

Egy személy T-sejt populációjának szelektív megváltoztatására tett erőfeszítések a múltban egyrészt teljes élő, vagy legyengített T-limfocitákkal való beoltásra fókuszáltak. Ezt a megközelítést összefoglaló munkát lásd [Cohen, I. R., *Immunol. Rev.*, 92, 5-21 (1986)]. A másik vizsgált terület a TCR egy specifikus peptidszakasza alapján kiválasztott peptidekkel való oltás volt. Ezek a megközelítések azon a jelenlegi nézőpontra alapultak, hogy a potenciálisan patogén T-sejtek előszeretettel használják a V

kódoló régiók egy korlátozott készletét. A megközelítés, melyet Cohen dolgozott ki, élő vagy gyengített T-sejteket használ oltás formájában többek között kísérletes autoimmun enkefalomielitisz (EAE) megelőzésére vagy kezelésére. Ez a megközelítés korlátozott azonban, mivel a betegség-függő T-sejtek klónjainak izolálásától függ: szükséges, hogy minden egyes beteget saját expandált sejtjeivel kezeljünk, tehát "testre szabott" vagyis egyéni terápiát követel. [Zhang és mtsai., *Science*, 261, 430 (1993)].

Mások a TCR-V-régióban szereplő peptidszakaszokon alapuló terápiát javasoltak [Offner, H., *Science*, 251, 430 (1991) (egy, a TCR-V β 8-régió aminosav-szekvenciáján alapuló peptiddel történő kezelés csökkentette a betegség súlyosságát, és gyorsította a gyógyulást Lewis patkányokban); Hashim, G. A., és mtsai., *J. Immunol.*, 149, 2803-2809 (1992); Offner, H., és mtsai., *J. Immunol.*, 148, 1706-1711 (1992); Offner, H., és mtsai., *J. Immunol.*, 146, 4165 (1991); de lásd Sun, D., *Cell. Immunol.* 141, 200-210 (1992). Ezek a peptidok általában rövidek, 8-25 aminosav hosszúságúak, de ritkán nagyobbak 30 aminosavnál. Például az EAE-vel összefüggő TCR-lánc részét képező 21 aminosav hosszú peptidet használtak, hogy megelőzzék az EAE kialakulását Lewis patkányokban (Vandenbark, A. A., és mtsai., *Nature*, 341, 482-483 (1989); Vandenbark, A. A., és mtsai., WO 91/01133-os számú nemzetközi közzétételi irat; ld. még Janeway, C. A., *Nature*, 341, 482-483 (1989)]. Mások még rövidebb, - a VDJ-régió β -láncának, vagy a $J\alpha$ -régiónak megfelelő - 8 vagy 11 aminosav hosszúságú peptidekről is hírt

adtak, melyek oltásként hatékonyak bizonyultak az EAE megelőzésében vagy súlyosságának csökkentésében, patkányt használva modellállatként. (Howell, M. D., és mtsai., 246, 668-671 (1989); Howell, M. D., és mtsai., WO 92/12996-os számú nemzetközi közzétételi irat].

TCR-fehérjékből származó peptideket gyakran választottak ki jelöltekként autoimmun terápiás célokra, mivel a peptidszintézis könnyen végrehajtható volt, és mivel más módszer nem volt elérhető, mellyel használható mennyiségű és jelentős biológiai aktivitású hosszabb TCR-V-régió-fehérjék előállítása lehetséges lett volna. Ami még fontosabb, a kis szintetikus peptidek fő hátránya az, hogy használatuk egy bizonyos szekvencia jóslását követeli meg, amely majd hatékony lesz az immunválasz modulálásában. A jóslásnak ki kell terjednie a javasolt peptidek várható antigén vagy immunogén tulajdonságaira, mint például előfordulásuk a V-régió hipervariábilis, vagy a komplementaritást meghatározó (CDR) régiójában. Ráadásul, az adott TCR-ből származó javasolt peptid méretét úgy kell meghatározni, hogy megmaradjon a normális építő-struktúrája és így szuppresszor T-sejt aktivitást legyen képes beindítani, illetve beindítsa az adott TCR-t (aminek a peptid megfelel) hordozó T-sejtek ellen irányuló antitestek keletkezését. Az ilyen peptidtervezés jelentős mennyiségű időt és kísérletezést kíván; számos esetben, ahol emberi terápiáról van szó, emberiességi és etikai okokból nem lehet elvégezni a szükséges kísérleteket.

Ezenkívül ahhoz, hogy a reguláló T-sejt specifikus antigénválaszt mutasson a peptidnek az egyén MHC molekuláihoz kell kötődnie. Ezeknek a célsejteken jelenlévő MHC antigéneknek polimorf régióik vannak, ahol a specifikus allélek adott személyre jellemzőek. Az esetek többségében a személyeknek két haplotípusuk van, ami azt jelenti, hogy az ugyanarról a lókusztól származó meghatározott MHC antigének két különböző allélja van. Nem minden peptid képes arra, hogy MHC antigénhez kötődjön, mint ahogy nem minden MHC antigén köt egyáltalán peptidet, mivel minden haplotípusra többféle MHC antigén létezik. Ezért minden egyes egyén haplotípusára ki kell dolgozni a T-sejt közvetítette terápia peptidekkel történő megközelítését, ami a peptideknek a "személyre szabását" jelenti.

Nagy mennyiségű, oldható TCR-fehérje előállítása rekombináns technikákkal számos okból problémát jelentett. Az egyik nagy legyőzendő akadály az oldható T-sejt antigénreceptor előállítása útjában az, hogy az a transzmembrán régió hiányában nem szekretálódik [Traunecker, A, és mtsai., Immunol. Today, 10, 29-32 (1989)]. Az egyik kutató egér TCR egy olyan teljes hosszúságú β -láncának szekrécióját tudta kimutatni, amely tartalmazta a V-, D-, és a J-régiókat, melyeket a C β -régió egy csonkított formája követett. A módszer azt használta ki, hogy az immunoglobulin könnyűlánc karboxi-terminális szekvenciája és a TCR β -láncának 241-es Cys-aminosava környezetében a szekvencia homológiát mutat. A kapott konstrukció a kiméra gént hasznosította, amely egyrészt az MPC-11-ből származó k-lánc

vezetőpeptid-szekvenciáját kódolta, másrészt egy átrendezett VDJ-exont. A kapott konstrukciót emlős sejtekben expresszáltatták, és a termék a sejtfelülűszóban detektálható volt. A módszer azonban nem tűnt alkalmasnak arra, hogy teljes hosszúságú V-régió-fehérjét nyerjünk vele idegen fehérjeszekvenciák távollétében, mivel a szekréció a csonkított C β -exon jelenlététől függött [Gascoigne, N., J. Biol. Chem., 265(16) 9296-9301 (1990)].

Egy másik csoport a TCR β -láncának biokémiaailag jelentős mennyiségben és oldható formában történő expresszióját úgy kísérte meg, hogy egy rekombináns, foszfatidil-inozitol-glikánhoz való kapcsolással lehorgonyzott TCR-heterodimert expresszáltatott. A módszer csupán kevés (0,5 mg/begyűjtés teljes hosszúságú TCR-lánc termelését tette lehetővé, amelyet még le kellett hasítani a fertőzött sejtek felszínéről egy foszfatidil-inozitol-specifikus foszfolipáz-C-vel [Lin, A. Y., Science, 249, 677-679 (1992)].

Mások kiméra molekulákat termeltek úgy, hogy az egér-TCR variábilis és konstans régióit kicserélték egy immunoglobulin κ láncának konstans régiójával. A kutatók képesek voltak egy heterodimer $\alpha\beta$ -TCR szekretált, oldható formájának a termeltetésére kis mennyiségben [Gregoire, C., és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8077-8081, (1991)]. Gregoire és mtsai. leírtak egy egér kimérát, ami a KB5-C2 V α - és V β -génjeiből, és az S105 monoklonális antitest κ -könnyűláncának C-régiójából áll. Leírtak továbbá egy V β C β C κ -kimérát. Mindkettővel emlős B-sejt mielómát fertőz-

tek, amely nem expresszál sem a natív immunoglobulin nehéz, sem a könnyű láncát. [Lásd még: Weber, S., és mtsai., Nature, 356, 793-795, (1992)]

Novotny és mtsai., [Novotny és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8646-8650, (1991)] bemutattak egy módszert oldható TCR-ek előállítására, melyek képesek antigént megkötni. Egy szintetikus oligonukleotid linkert klónoztak a V β -régió C-terminálisára, és a V α -régió N-terminálisára, amelyek így tehát egyetlen V β V α -láncot alkottak. A kapott expressziós vektor kódolja tehát a pelB-vezetőszekvenciát, melyet közvetlenül a V β követ a leolvasási keretbe illeszkedve, a linkert és a V α -szegmenst. A konstrukció expressziója a lacZ-promóter ellenőrzése alatt áll, így tehát IPTG-vel indukálható.

Legújabbban egy csoport kis mennyiségű, T-sejt-receptor V-régiójának karboxi-terminálisához kötött polihisztidin toldalék, avagy "farok" révén nyert fúziós fehérje szekrécióját írta le. A plazmidok pelB-vezetőszekvenciát tartalmazták, és kémiaailag indukálható promóter ellenőrzése alatt álltak [Ward, E. S., Scand. J. Immunol., 34, 215-220, (1991)]. Ez a munka nem szól arról azonban, hogyan nyerhetünk a fuzionált résztől mentes T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjét, vagy a receptor V-régiójából gazdaságilag hasznosítható mennyiséget.

Nagy szükség van tehát olyan hatóanyagokra és gyógyászati készítményekre, melyeknek megvan az a tulajdonságuk, hogy specifikusan célzott immunválaszt képesek ki-

váltani, szelekciójuk megjósolható, valamint kényelmesen és reprodukálhatóan előállíthatóak.

A találmány szerinti megoldás a fent vázolt problémákat kísérli meg orvosolni a találmány tárgyát képező eljárással, amely első ízben alkalmas egy olyan univerzális hatóanyag előállítására, mellyel adott T-sejt alcsoportokat érintő T-sejt közvetítette betegségek kezelhetők. A találmány tárgyát képezik továbbá hasznos mennyiségű TCR-V-régió-fehérjék, melyek természetes módon processzálhatók, s melyekből az *in vivo* processzálas során számos aktív fragmens keletkezik melyeket minden egyes személy antigén prezentáló sejtjei bemutatnak. Így tehát nincs szükség "személyre szabott" terápiás hatóanyagokra. A találmány tárgyát képezi továbbá a rekombináns expressziós vektorok egy sorozata, amely alkalmas TCR-V-régió-fehérjék előállítására baktériumban. A találmány tárgyát képező TCR-V-régió-fehérjék használhatók immunológiai megbetegedések kezelésére, megelőzésére és szuppressziójára. A találmány egy megvalósítási módja során a TCR-molekulákat egy gyógyszerilag elfogadható hordozóhoz keverjük, terápiás készítményként való felhasználás céljából. Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány szerinti igényelt V-régió-fehérjék alkalmasak TCR-elleni antitestek előállítására. Másik mód szerint a TCR-V-régió-fehérjéket a diagnosztikában lehet felhasználni, egyes immunológiai megbetegedések jellemzésére. A találmány szerinti TCR-V-régió-fehérjék - antitestkötő képességük révén - diagnosztikai próbákként használhatók. A találmány szerinti megoldás előnye, hogy a T-sejt-

antigénreceptor-V-régió-fehérjéket önmagukban, azaz nem fúziós fehérjeként és affinitási toldalék ("farok") távollétében expresszáltatjuk. A találmány szerinti megoldás további előnye, hogy a TCR-V-régió-fehérjéket gazdaságilag hasznosítható mennyiségben termelhetjük, ami lehetővé teszi T-sejt által közvetített autoimmun betegségek kezelésében terápiásan hatékony készítmények előállítását.

A találmány tárgyát képezi a fentiekén kívül egy expressziós vektor egy szennyezésmentes, teljes hosszúságú TCR-V-régió-molekula előállítására. A találmány szerinti expressziós vektorok lényeges elemét képezi egy, a T-sejt-antigénreceptor-V-régióját kódoló régió. A találmány szerinti TCR-t kódoló régió bármely nukleinsav-molekula lehet, amely a teljes hosszúságú TCR-V-régió-fehérjét kódolja. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a TCR-t kódoló régió egy, a $\nu\beta 5.3$ -régiót kódoló struktúrgén szekvenciáját tartalmazza.

Az itt leírt expressziós vektorok alkalmasak a TCR V-régió-fehérjéinek indukálható expresszáltatására. Az előnyös megvalósítási módok szerint a T-sejt-antigénreceptor-V-régió kódoló szekvencia transzkripciója egy indukálható bakteriális promóter kontrollja alatt van. A találmány szerinti megoldásban az indukálható bakteriális promóter akár kémiaiilag, akár hőmérséklet-változtatással regulálható. Előnyösebben, az indukálható bakteriális promóter hőmérséklet-változtatással regulálható.

Az egyik megvalósítási mód szerint a találmány szerinti expressziós vektor része egy reguláló gén, amely egy,

a promóterhez kötődni képes fehérjét kódol ezzel megakadályozva az indukálható promóter transzkripcióját. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a promóter az *E. coli lac*-operonjáról származik, és a regulációs gén része az *E. coli lacI*-represszorgén funkcionálisan mutáns formája is. Ez a mutáns *lacI*-gén (*lacIts*) egy hőérzékeny represszorfehérjét kódol, ami lehetővé teszi a promóter hőmérséklet-emeléssel való indukcióját. Egy előnyös megvalósítási mód szerint az indukálható bakteriális promóter a *trc*-promóter, és a hőmérséklet-emeléssel való indukciót a *lacIts* regulációs gén biztosítja.

A találmány egyik megvalósítási módja szerint a regulációs gén egy kotranszformált vektoron van. Egy másik megvalósítási mód szerint a regulációs gén a bakteriális gazdasejt kromoszómáján helyezkedik el. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a regulációs gént a rekombináns expressziós vektor tartalmazza. Egy további előnyös megvalósítási mód szerint a mutáns *lacI*-gén transzkripciójának iránya megegyezik az expresszálandó T-sejt-antigénreceptor struktúrgénjével.

A találmány szerinti expressziós vektorok előnyösen tartalmazhatják egy vezető- vagy szignálpeptid kódoló szekvenciáját. Egy ilyen vezetőszekvencia a leolvasási keretbe illesztve és az expresszálandó TCR-V kódoló régiótól 5'-irányban elhelyezve egy olyan V-régió-fehérje szintézisét irányítja, amelynek egy N-terminális szignálpeptidje van. Ez a szignálpeptid irányítja a rekombináns fehérje szekrécióját a gazdasejt membránján keresztül. A találmány egyéb

megvalósítási módjai szerint nem használunk vezetőszekvenciát, és a kívánt V-régió-terméket a sejtekből izoláljuk pl. karbamiddal történő extrakcióval.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti rekombináns vektor a következőket tartalmazza 5'-től 3'-irányban: egy *trc*-promótert, egy riboszómakötő helyet, egy opcionális vezetőszekvenciát, egy teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régiót kódoló régiót, egy stop kódot, egy vagy több transzkripciós terminációs helyet, egy *lacI*ts regulációs gént, amely úgy helyezkedik el, hogy transzkripciójának iránya megegyezik a T-sejt-antigénreceptor V-régiójának kódoló régiójáéval. Tartalmaz továbbá egy bakteriális replikációs origót és egy tetraciklin-rezisztenciagént.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás, amely alkalmas TCR-V-régió-fehérjék előállítására lényegesen nagyobb mennyiségben, mint amilyen mennyiségeket korábban leírtak.

A találmány tárgyát képezik készítmények és eljárások, melyek alkalmasak immunológiai megbetegedésekben szenvedő betegek kezelésére. Egy ilyen kezelés magában foglalja a találmány szerinti készítmény beadását a kezelésre szoruló személy számára, olyan mennyiségben és annyi ideig amennyi alkalmas az említett immunológiai megbetegedés rendbehozatalára. A találmány szerinti készítmények előnyösen lehetővé teszik az immunológiai megbetegedések kezelését anélkül, hogy egy meghatározott peptidfragmenst kellene

kiválasztani, vagy az egyes készítményeket az egyes kezelendő személyek igényeihez kellene szabni.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás, amely alkalmas teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje felhasználására autoimmun betegség vagy rendellenesség terápiájában. A találmány egyik megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezi egy eljárás, amely alkalmas egy teljes hosszúságú V β 5.3-fehérje felhasználására a terápiában. Egy másik megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezi egy eljárás, amely alkalmas egy teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje felhasználására egy autoimmun betegség vagy rendellenesség kezelésére szolgáló gyógyszer elkészítésében. Ezért, az egyik megvalósítási mód szerint a találmány lehetővé teszi a teljes hosszúságú V β 5.3-fehérje felhasználását immunológiai megbetegedések vagy rendellenességek - mint pl. az MS - kezelésére szolgáló gyógyszerek előállításában.

Az alábbiakban röviden leírjuk a leíráshoz csatolt ábrákat.

Az 1. ábrán a találmány szerinti teljes hosszúságú V β 5.3-fehérje a szekvenciafelsorolásban 25-ös és 26-os azonosítószámon megadott nukleotidszekvenciája az ugyanott 27-es azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciája látható.

A 2. ábrán a pKTB-V β 5.3-plazmid térképe található. Ez a plazmid P trc -t azaz trc -promótert tartalmaz; valamint g10 -et, a T7 bakteriofágból származó g10 -vezetőgén-szegmenst; SD1 -et, azaz az 1-es számú riboszómakötő helyet;

MC-t, egy minicisztront, amely az AAG GAG 2-es számú riboszómakötőhelyet (SD2) (ld. a szekvencialistában a 28-as azonosítószámon megadott teljes minicisztron nukleotid-szekvenciát) és a Met Tyr Arg Leu Asn Lys Glu Glu peptidet kódolja (29-es azonosítószámon megadott szekvencia); STII-t azaz az STII vezetőszekvenciát; V β 5.3-at azaz a V β 5.3 kódoló régiót; T1-et és T2-t, az *rrnB*-operon transzkripció terminációs helyeit; a *lacI*ts gént, amely a hőérzékeny *lac*-represszort kódolja; a replikációs origót (Ori) és a tetraciklin rezisztencia gént (Tet^r).

A találmány tárgyát képezik rekombináns expressziós vektorok és eljárások, melyek alkalmasak nagy mennyiségű T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje hatékony előállítására, valamint ezek alkalmazása immunológiai megbetegedések és rendellenességek diagnosztizálására, kezelésére, megelőzésére és/vagy szuppressziójára.

Vektorok egy sorozatát fejlesztettük ki teljes hosszúságú TCR-V-régió-fehérjék megnövelt szintű előállítására. A találmány tárgyát képezi ezenkívül egy eljárás is, amely alkalmas teljes hosszúságú TCR-V-régió-fehérjék gazdaságilag hasznosítható mennyiségben történő előállítására, a találmány szerinti expressziós vektor felhasználásával.

A találmány szerinti eljárások és expressziós vektorok egyedülállóak, mivel idegen fehérje szekvenciák és fúziós partnerek nélkül alkalmasak teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió előállítására. Amint azt fent részletesen leírtuk, T-sejt-antigénreceptor-V-régiókat régebben csupán egy nagyobb fehérje részeként, nagyon kis

mennyiségben állították elő. A külső fehérje nem kívánt immunogenitást okozhat *in vivo* használata során, és a szabályozó hatóságok gyakran idézik ezeket, mint megengedhetetlen szennyeződések. A korábban tisztított V-régió-fehérjék a TCR más régióit is tartalmazták, mint például a C-régiót a V-régióhoz fuzionálva. Mások olyan expressziós rendszer konstrukciókat készítettek, amelyek a TCR-V-régiót kiméra fehérjeként állítják elő, pl. a V-régiót fuzionálták az immunoglobulin-molekula egy részletéhez.

A találmány szerinti expressziós vektorok és eljárások alkalmasak továbbá egy T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje megnövelt szintű expressziójára. Az elsődleges szempont, amikor egy gazdaságilag - például a kutatás, diagnosztika és terápiás kezelés területén - hasznosítandó fehérje előállításáról van szó, a fehérje gazdaságilag hasznos mennyiségben történő elkészítése. A találmány szerinti megoldás alkalmazásával tehát fokozott mennyiségben állíthatunk elő TCR-V-régió-fehérjéket. A találmány szerinti megoldás lehetővé teszi V-régió-fehérjék nagy mennyiségben történő előállítását, pl. 1 és 500 mg/liter baktériumsejt-kultúra közötti, vagy ennél is nagyobb mennyiségben. Előnyösen, a TCR-V-régió-fehérje termelésének a szintje legalább 100 mg/liter. A találmány legelőnyösebb megvalósítási módja szerint a termelés legalább 300 mg V β fehérje egy liter baktériumsejt-kultúrában.

A találmány szerinti eljárások és expressziós vektorok alkalmasak idegen fehérjeszekvenciák nélküli TCR-V-régió-fehérje előállítására. A találmány szerinti megoldás-

ban így egy TCR-V-régió-fehérje tiszta formában való előállításához kevesebb tisztítási lépés szükséges, mint a technika állása szerinti előállítási módok esetében. Az egyik megvalósítási mód szerint, a találmány szerinti megoldásban hőindukció segítségével megnövekedett V-régió-fehérje expressziót érünk el, ami lehetővé teszi kémiai indukálószerkeket (mint pl. az IPTG) használatának az elkerülését.

Mivel a TCR-V-régió-fehérjéket a találmány szerinti megoldásban idegen fehérjék nélkül termeltetjük, a találmány szerinti megoldásban egyszerűsített eljárással viszonylag tiszta terméket állítunk elő. A találmány szerinti megoldás kiküszöböli az olyan járulékos tisztítási lépéseket, mint pl. enzimek, vagy kémiai reagens bevitel a rendszerbe annak érdekében, hogy fúziós peptid-szegmenseket vagy affinitási kromatográfiához szükséges toldalékokat, "farkokat" távolítsunk el. Az ilyen manipulációk nem csupán nagy valószínűséggel csökkentik a visszanyerhető V-régió-termék mennyiségét, hanem olyan anyagokat is bejuttatnak, melyeket aztán újfent el kell távolítani pl. további tisztítási lépések segítségével.

A találmány szerinti T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje bármely teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió. Egy teljes hosszúságú TCR-V-régió-fehérjét a T-sejt-antigénreceptor V-régiójának egy kódoló régiója kódol. A TCR-V-régió kódoló régiója egy nukleotidszekvencia, amely egy teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjét kódol. Jelen leírás vonatkozásában a V-régió magába foglalja a T-sejt-antigénreceptor va-

riábilis régióját. A legtágabb értelemben, a jelen kitanítás alkalmas lehet TCR-fehérjék fokozott mértékű expresszáására, beleértve a V-régiót, továbbá a D és/vagy a J-régiók egészét vagy részleteit.

A TCR-V-régió-fehérje előállítása idegen fehérjeszekvencia nélkül történik, azaz például egyéb TCR-régiók, mint például a konstans régió, a transzmembrán régió vagy a citoplazmatikus régió nélkül. Továbbá, a találmány szerinti TCR-V-régió-fehérje előállítása nem TCR-eredetű fúziós partnerek, mint például affinitási kromatográfiához szükséges toldalékok nélkül történik. Továbbá, a találmány szerinti TCR-V-régió-fehérje előállítása nem egy nagyobb, kiméra - más fehérjemolekulák (mint például egy immunglobulin) részeit magába foglaló - fehérje részeként történik.

Felismerve, hogy a DNS szekvencia, amely egy T-sejt receptor V-régió kplementaritást meghatározó régióinak (CDR-ek) egyikét kódolja valójában átérheti az ismert összekötő részt a V és a D kódoló régió között (mint például a V β 5.3 CDR3-ja esetében), a leírásban használt értelemben a "teljes hosszúságú" V régió kódoló régiója tartalmazhatja a teljes, V-D összekötő részt is átívelő CDR teljes kódoló szekvenciáját, egy ilyen CDR azon részletét, amely csupán az ismert V-régión van jelen, vagy semennyit sem a CDR-t kódoló szekvenciából. Továbbá, a találmány szerinti teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje a T-sejt-antigénreceptor-V-régiók bármelyike lehet, és nem korlátozódik csupán a V β -régiókra (azaz a TCR β -láncának V-

régióira). Ezért, T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje az α -, a β -, a δ -, vagy a γ -alegység variábilis régiója lehet.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint, a találmány szerinti TCR-V-régió-fehérje bármely T-sejt-antigénreceptor-V-régió, melyhez teljes hosszúságú kódoló szekvencia hozzáférhető. Ilyen a találmány szerinti teljes hosszúságú kódoló szekvenciák kinyerésére szolgáló eljárások jól ismertek a technika állása szerint. Az emberi V-régió domén DNS-szekvenciáit számos emberi sejtből jól ismert módszerekkel összhangban izolálni lehet. Előnyösen, a sejtek perifériás vér T-limfociták.

A találmány szerinti DNS-szekvenciákat különböző módokon lehet preparálni. Előnyösen, a T-sejt-antigénreceptor V-régiója DNS-szekvenciáját polimeráz-láncreakcióval (PCR) preparálhatjuk, az érintetlen TCR-t kódoló szekvenciákat használva templátokként. Egy emberi $V\beta$ -régión például emberi, anti-CD3 antitesttel stimulált perifériás vér limfocitákból lehet preparálni, a cDNS amplifikálása útján, Choi és mtsai. módszerét követve [Choi és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8941-8945, (1989)].

A találmány szerinti megoldás egyik megvalósítási módja szerint a teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió bármely klónból nyerhető, amely a teljes hosszúságú szekvenciát tartalmazza. Például, jónéhány TCR-V-régió-szekvenciát és a teljes hosszúságú kódoló régiót tartalmazó cDNS klónt írtak le Concannon és mtsai. [Concannon és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6598-6602 (1986)].

A találmány szerinti megoldásban előnyösen alkalmazható TCR-V-régió-fehérjék azok, amelyek szerepet játszanak egy immunológiai megbetegedésben vagy rendellenességben, különösen pl. a V β 8.1 (Kawasaki-kór ld. [Abe és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4066, (1992)]), V β 6.1 (lepra, ld. [Wang és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 188, (1993)]), V β 5.1 (Lyme-kór, ld. [Laheema és mtsai., J. Immunol., 150, 4125, (1993)]), V β 5.2, vagy V β 5.3, vagy V β 6.1 (szklerózis multiplex, ld. [Kotzin és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9160, (1991)]), V β 2.1 vagy V β 3.1 (rheumatoid arthritis, ld. [Uematsu és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8534, (1991)]). Lásd még [Hafler, D. A. és mtsai., J. Exp. Med., 167, 1313, (1988); Mantgazza és mtsai., Autoimmunity, 3, 431, (1990).

A TCR, melyet egy autoimmun betegségben egy T-sejt klón expresszál, vagy egy T-sejt klón, amely egy bizonyos autoantigénre válaszol, azonosítható TCR-specifikus antitesteket használva, poliklonális, monoklonális, vagy kiméra antitesteket használva például, melyek a TCR variábilis szegmensére specifikusak. Az azonosításhoz egy antitestjelölő eljárás is szükséges, amely fluoreszcens mikroszkópia, áramlási citometria, immuncitokémia vagy más, a technika állása szerint ismert módszer. Ilyen antitesteket számos TCR- α - és/vagy - β -lánc-V-régióra leírtak (lásd pl. a WO 90/06758-as számú nemzetközi közzétételi iratot) .

Másik lehetőség, hogy a T-sejt klón DNS-ét vagy RNS-ét vagy közvetlenül mutatjuk ki, vagy PCR-rel történő amplifikáció után [Synha és mtsai., Science, 239, 1026,

(1988), Saiki és mtsai., Nature, 324, 163, (1986)], különböző TCR-géncsaládokhoz készült nukleinsav-próbával történő hibridizációval, a technika állása szerint jól ismert hibridizációs technikákat használva. Így a TCR szekvenciáját, vagy egy részletét közvetlenül megkaphatjuk az amplifikált és átrendeződött DNS-ből, vagy RNS-ből.

Egy adott TCR expresszióját azonosíthatjuk a TCR-nek legalább egy részletét kódoló nukleinsav-szekvencia meghatározásával is, a TCR-V-gén klónozása után például, vagy a TCR-fehérje legalább egy részlete aminosav-sorrendjének meghatározásával. Szakember számára nyilvánvaló, hogy a fent említett megközelítések bármelyike, vagy egyéb szakember által ismert megközelítés a T-sejten, klónon, vagy T-sejtvonalon expresszált TCR azonosításához vezet.

A következő példákat adjuk meg molekuláris megközelítésekre, melyek TCR-gén expressziójának betegséggel való korreláltatására használhatók:

1. DNS könyvtárak készítése és analízise, melyek egy vagy több beteg személy betegséggel összefüggő T-sejtjeiből készülnek a gyakran használt "domináns" TCR-gének jelenlétének meghatározása végett;
2. betegből származó minták Southern-analízise annak megállapítása érdekében, hogy van-e specifikus genetikai polimorfizmus (pl. RFLP), vagy oligoklonális TCR-átrendeződés;

3. betegből származó minták analízise cDNS szintézissel, PCR amplifikációval és "slot blot" hibridizációs eljárással; és

4. TCR-próbák *in situ* nukleinsav hibridizációjával T-sejtekhez ezen sejtek előzetes tenyésztése nélkül.

Előnyös TCR-V-régió-fehérje pl. a V β 8.1, V β 5.2, vagy a V β 5.3. A V β 5.3-at kódoló kettős szálú cDNS, és a V β 5.3 aminosav-szekvenciája az 1. ábrán látható. (Ld. a 25-ös, 26-os és 27-es azonosítószámon megadott szekvenciákat.)

Szakember számára ismert eljárásokkal T-sejt-antigénreceptor-V-régió-klónokat juttathatunk be a találmány szerinti expressziós vektorokba. Például, egy cDNS klónból a V-régiót PCR-rel megszintetizáljuk úgy, hogy 5'-láncvégén egy kezdő ATG-t tartalmazzon. Bármely alkalmas restriktációs hasítási helyet kiépíthetünk, amely tartalmaz egy kezdő kódot, és beilleszthető a V-régió kódoló régiójának 5'-láncvégére. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a restriktációs hasítási hely a *Nco*I-hely. A V-régió kódoló régiójának 3'-végére egy stop kódot, és egy megfelelő restriktációs hasítási helyet építettünk ki, hogy vektorba lehessen szubklónozni.

Szakember számára világos, hogy a találmány szerinti eljárások nemcsak emberből hanem más állatfajból származó teljes hosszúságú TCR-V-régió elkészítésére is alkalmasak.

Az igényelt oltalmi körbe tartozó expressziós vektor például egy olyan plazmid, amely exogén DNS-t tartalmaz az expresszálandó TCR-V-régiót kódoló nukleinsav formájá-

ban. A találmány szerinti rekombináns vektort a bakteriális gazdasejtbe például transzformálással juttathatjuk be, a kívánt V-régió-fehérjét expresszáló transzformánsokat izoláljuk, és klónozzuk.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan expressziós vektorok, melyek tartalmazzák a teljes hosszúságú TCR-V-régió-fehérjét kódoló DNS-szekvenciát. Előnyösen, a TCR-V-régió-fehérjék a kitanításban specifikusan leírt T-sejt antigénreceptor fehérjék. A találmány szerinti megoldásban alkalmazott expressziós vektor egy plazmid, amelyikben az expresszálandó TCR-V-régió-gén regulációs elemek transzkripció és transzláció kontrollja alatt van, amilyen például a promóter, a riboszómakötő-hely, és a transzkripció terminációs hely. Ezeken felül tartalmaz egy replikációs origót, amely a baktériumban történő stabil replikációt biztosítja. Előnyösem, a plazmid tartalmaz egy gént, amely antibiotikum-rezisztenciát kódol, így lehetővé téve a plazmidot hordozó transzformált sejtek szelekcióját. A klónozott szekvencia expresszója akkor következik be, ha az expressziós vektort megfelelő gazdasejtbe juttatjuk.

A találmány szerinti megoldásban használható expressziós vektorok gyakran plazmidok. A plazmidok cirkuláris kettős szálú DNS-szekvenciák, amelyek nincsenek a kromoszómába integrálva. A találmány szerinti expressziós vektorok egyéb DNS-szekvenciákat is tartalmazhatnak, mint pl. vezető- vagy szignálszekvenciákat, melyek az expresszió termékének célba jutását, vagy a stabilitását biztosítják,

valamint/vagy regulációs szekvenciákat, melyek a gén-expresszió szabályzását teszik lehetővé, pl. válaszként hőmérsékletemelésre, vagy a táptalaj összetételének megváltozására.

Az expressziós vektorok ezeket a kontroll szekvenciákat a TCR-V-régiót kódoló DNS-szekvenciához működőképesen kapcsolva vannak. A leírásban használt értelemben a "működőképesen kapcsolt" azt jelenti, hogy egy nukleinsav-szekvencia, melynek génexpressziót szabályzó hatása van, vagy egy funkcionális fehérjedomént kódol kovalensen kötve van, akár a 3', akár az 5' vég felől egy második, fehérjét kódoló nukleinsavhoz, így a szabályzó funkció hatást gyakorol a második nukleinsav-szekvenciára, vagy pedig a kódolt funkcionális domén keretbe illesztve fuzionálódik a második nukleinsav kódolta fehérjével. Ilyen, tipikus, a gén-expressziót szabályzó funkciók például a transzkripció elkezdése, befejezése, a mRNS transzkriptum processziója. Ilyen, génexpressziót szabályzó funkcióval bíró nukleinsav-szekvenciák lehetnek például transzkripciós promóterek, transzkripciós terminációs helyek és mRNS processziós jelek. Funkcionális domének, melyek működőképesen kapcsolva vannak egy másik fehérjéhez lehetnek például vezető-, vagy szignálpeptidek, melyek lehetővé teszik a fehérje transzportját sejtmembránokon keresztül.

A találmány egyik megvalósítási módja szerint a promóter indukálható promóter lehet. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a promótert a táptalaj egyes komponenseinek jelenléte vagy hiánya szabályozza. Szakember számára

nyilvánvaló, hogy néhány bakteriális promóter, melyet a táptalaj egyes komponenseinek jelenléte vagy hiánya szabályoz alkalmas a találmány szerinti expressziós vektorokban történő felhasználásra. Előnyösen, a promóter egy erős bakteriális promóter, mint pl. a *lac*-promóter, a *tac*-promóter és a *trc*-promóter. Ezért, a találmány egyik megvalósítási módja szerint a TCR-V-régió kódoló szekvenciához kapcsolt promóter egy, a találmány szerinti vektorban az izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG) jelenlétével, vagy hiányával szabályozható. Az IPTG a *lac*-promóter, a *tac*-promóter és a *trc*-promóter kiváló kémiai indukáló molekulája. Előnyösen, az IPTG-vel indukálható promóter a *lac*-promóter vagy a *tac*-promóter. Egy előnyösebb megvalósítási mód szerint az IPTG-vel indukálható promóter a *trc*-promóter [Brosius és mtsai., J. Biol. Chem., 260, 3539-3541, (1985)], amely hasonlít a *tac*-promóterhez, amely a *lacUV5*-promóter -10-régiójának a triptofánoperon -35-régiójával való fúziójából származik [de Boer és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 21-25, (1983); Amann és mtsai., Gene, 25, 167-178, (1983)]. A *trc*-promóter azonos a *tac*-promóterrel egyetlen bázispár-változtatás kivételével [Brosius és mtsai., ld. fent].

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint a találmány szerinti expressziós vektort úgy módosítottuk, hogy lehetővé tegye a találmány szerinti teljes hosszúságú TCR-V-régió-fehérje szekretált expresszióját hőmérséklet-emelés hatására. Ezen megvalósítási mód szerint az expressziós vektor lehetővé teszi TCR-V-régió-fehérjék expresszióját kémiai indukálószer hiányában is, ami kikü-

szöböli a szükségét olyan elemek használatának, mint az IPTG és *lacI*- vagy *lacI^q*-géneket tartalmazó bakteriális sejtvonalak. A találmány szerinti expressziós vektorok előnyös megvalósítási módjaiban szerepet kap egy szabályozó gén, ami lehetővé teszi a fehérjeexpresszió hőindukcióját. A szabályozó génszekvencia legelőnyösebben a *lacI_{ts}* gén, amely egy hőmérsékletre érzékeny *lac*-represszort kódol.

Egy további előnyös megvalósítási mód szerint a *lacI_{ts}* gén a transzkripció terminációs helytől 3' -irányban és hozzá a lehető legközelebb helyezkedik el, transzkripció irányja pedig ugyanaz, mint a V-régió kódoló szekvenciájáé.

Ezeken felül a találmány szerinti expressziós plazmidok előnyösen tartalmaznak egy vagy több szelekcióra alkalmas genetikai markert. Előnyösen a szelekcióra alkalmas genetikai marker antibiotikum (például ampicillin, kanamicin vagy tetraciklin) elleni rezisztenciát biztosít. Legelőnyösebben a szelekciós marker a tetraciklin rezisztencia gén.

A fentiekén kívül a vektor tartalmaz egy bakteriális replikációs origót. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a replikációs origó a pBR322-ből származik. Az expressziós vektor egy riboszómakötő-helyet is tartalmaz, és az *E. coli rrnB* riboszómális RNS-operonjának transzkripció terminációs helyét [Brosius és mtsai., *Plasmid*, 6, 112-118, (1981)]

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a találmány szerinti expressziós vektor a következő lényeg-

ges elemet tartalmazza 5'-3' -irányban: Egy DNS-szekvenciát, amely egy promótert és egy operátort tartalmaz; egy DNS-szekvenciát, amely egy riboszómakötő-helyet tartalmaz a kívánt gén mRNS-e érdekében, hogy a gazdasejtben riboszómához köthessen; egy ATG iniciációs kódont, vagy egy DNS-szekvenciát, amely átalakul ATC iniciációs kódonná a kívánt gén vektorba történő inszerciója során; egy restriktív hasítási helyet a kívánt gén ATC iniciációs kódonnal egy leolvasási keretbe történő inszerciója végett, vagy egy sokszoros klónozóhelyet, amely jónéhány hasítóhelyet tartalmaz, hogy a megfelelő expresszálandó gént vagy kódoló régiót inszertálhassuk; egy T-sejt-antigénreceptor-V-régiót kódoló nukleotid-szekvenciát, melyet expresszáltatni kívánunk; valamint egy transzkripció terminációs helyet, amely a transzkripció hatékony leállítására szolgál. A vektor tartalmaz egy DNS-szekvenciát is, amely a gazdasejtben autonóm módon replikációra képes bakteriális plazmidból származó replikációs origót tartalmazza, valamint egy szelektálható és azonosítható, fenotípusra jellemző vonáshoz kapcsolódó gént kódoló DNS-szekvenciát, ahol a fenotípusra jellemző vonás nyilvánvalóvá válik, amikor a vektor jelen van a gazdasejtben. Az expressziós vektor adott esetben tartalmazhat egy szignál- vagy vezető-kódoló szekvenciát, amely működőképesen hozzá van kapcsolva (azaz a leolvasási keretbe van fuzionálva) a TCR-V-régiót kódoló nukleinsav-szekvencia 5'-végéhez úgy, hogy a vezető-szekvencia - TCR-V-régió-szekvencia transzlációja egy vezető-peptid - TCR-V-régió fúziós fehérjét eredményez, melyben a fúziós fehérje

aminoterminális vezetőpeptidje irányítja a TCR-V-régió-fehérje szekrécióját a gazdasejt membránján keresztül. Egyes előnyös megvalósítási módok szerint az expressziós vektor egy szabályozó gént tartalmaz, amely lehetővé teszi a szekréciós fehérje expresszióját hőmérsékletemelés hatására.

A találmány egy előnyösebb megvalósítási módja szerint az expressziós vektor a következő lényeges elemeket tartalmazza 5'-3'-irányban: *trc*-promótert, amely a *lacUV5*-promóter -10-régiójának a triptofánoperon -35-régiójával való fúziójából származik [de Boer és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 21-25, (1983); Amann és mtsai., Gene, 25, 167-178, (1983)]; egy erős riboszómakötő helyet; az expresszálandó TCR-V-régiót kódoló régiót; a két transzkripciós terminációs helyet az *rrnB* riboszómális RNS-operonról; a *lacI_{ts}*-gént, amely a hőérzékeny *lac*-represszort kódolja; a pBR322-ből származó replikációs origót és a tetraciklin-rezisztenciagént. Egy ilyen előnyös megvalósítási módra példaként szolgáló expressziós vektort - a pKBi-Vβ5.3-jelűt - letétbe helyeztünk az "American Type Culture Collection"-nél (ATCC), a Budapesti Szerződés értelmében, nyilvántartási szám: 69739.

A találmány szerinti expressziós vektorok tartalmazhatnak egy szignálpeptidet kódoló vezetőszekvenciát, amely a TCR-V-régió kódoló régiójától 5'-irányban működőképesen kapcsolva van. Az expresszió során az aminoterminális szignálpeptid irányítja a TCR-V-régió-fehérje szekrécióját a gazdasejt membránján keresztül a

periplazmába, vagy a citoplazmába. Szakember számára világos, hogy sokféle vezetőszekvencia használható a találmány szerinti expressziós vektorral. Az egyik alkalmas vezetőszekvencia a *pelB*-szignálszekvencia az *E. carotovora*ból [Lei és mtsai., J. Bacteriology, 169, 4379-4387, (1987)]. Egy másik alkalmas vezetőszekvencia az *E. coli* hőstabil enterotoxin-II (STII) szignálszekvenciája [Morioka-Fujimoto és mtsai., J. Biol. Chem. 266, 1728-1732, (1991)]

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint az expressziós rendszer tartalmazza az STII vezetőszekvenciát, és a V-régió kódoló régiót PCR-rel megszingetizáljuk úgy, hogy tartalmazzon egy megfelelő hasítóhelyet a 3'-végén, és egy mesterséges *MluI*-hasítóhelyet az 5'-végén, így kényelmesen kovalensen beköthetjük az *MluI*-helyre, melyet az STII-vezető 3'-végére juttattunk be. Ezért, egy további előnyös megvalósítási mód szerint, az expressziós vektor a következőket tartalmazza 5'-3'-irányban: *trc*-promótert, amely a *lacUV5*-promóter -10 régiójának a triptofánoperon -35-régiójával való fúziójából származik; egy erős riboszómakötő helyet; az STII vezetőszekvenciát; az expresszálandó T-sejt-antigénreceptor-V-régió kódoló régiót; a transzkripció terminációs helyeket az *rrnB*-operonról; a *lacI_{ts}*-gént, amely a hőérzékeny *lac*-represszort kódolja; a pBR322-ből származó replikációs origót és a tetraciklin-rezisztenciagént. A találmány legelőnyösebb megvalósítási módja szerint az expressziós vektor a pKB-V β 5.3.

A találmány szerinti expressziós vektorok a technika állása szerinti standard technikák felhasználásával elkészíthetők. [lásd pl. Maniatis és mtsai., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA (1982)]

A találmány tárgyát képezik továbbá teljes hosszúságú TCR-V-régiót kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó expressziós vektorokkal transzformált gazdasejtek. Ezenkívül az előnyösen alkalmazott gazdasejtek olyan expressziós vektort tartalmaznak, melyben egy vagy több kontroll DNS-szekvencia van, amelyek alkalmasak a teljes hosszúságú TCR-V-régió-fehérjét kódoló DNS-szekvencia replikációjának és/vagy expressziójának irányítására. A megfelelő gazdasejtek prokarióta sejtek; prokarióta gazdasejtként előnyösen baktériumsejtet alkalmazunk; legelőnyösebben *E. coli* sejtet. Szakember számára a bejelentésben levő kitanítás alapján érthető, hogy a használt egyes expressziós vektorok befolyással bírnak arra, hogy milyen bakteriális gazdasejtet válasszunk a teljes hosszúságú TCR-V-régió-fehérje termelésére. Például a találmány szerinti megoldásban alkalmazott kémiai indukálható expressziós vektorok esetében a *tcr*-promótert szabályozó *lacI*- vagy a *lacI^q*-gént tartalmazó bakteriális gazdasejtek különösen előnyösek. A találmány szerinti megoldásban alkalmazott olyan expressziós vektorok esetében azonban, amelyek tartalmaznak szabályozó gént, mint a *lacI_{ts}*-gén, amely hőérzékeny represszorért felelős, a vad típusú *lacI*- vagy a *lacI^q*-gént nem tartalmazó bakte-

riális gazdatörzsek az előnyösek. Egy különösen előnyös gazdasejt az LJ24.

A találmány egyes megvalósítási módjai szerint a találmány szerinti expressziós vektor nem tartalmaz vezetőszekvenciát. A találmány egyes előnyös megvalósítási módjai szerint a bakteriális gazdasejt az *E. coli* BL21, vagy még előnyösebben egy proteázhiányos *E. coli* törzs, mint pl. az SG2163, SG22094, vagy az SG21173.

A találmány szerinti expressziós vektorokat a technika állásából ismert különböző módszerekkel juttathatjuk be a gazdasejtbe, esetleg a gazdasejt típusától függően. Például a kalcium klorid kezelés, vagy az elektroporáció közönségesen használt a prokarióta sejtek esetében. [lásd, általánosságban Maniatis és mtsai., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA (1982)]

Ha az expressziós vektort bejuttattuk a megfelelő gazdasejtbe, a gazdasejtet tenyészthetjük olyan körülmények között, amelyek nagy mennyiségű TCR-V-régió-expressziót tesznek lehetővé.

TCR-V-régió-fehérjét kódoló DNS-t tartalmazó expressziós vektorokat gazdasejtként tartalmazó sejteket megfelelő módokon azonosíthatjuk. Az alábbi példákban például, a V-régió-fehérjét immunológiai mérési eljárással azonosítottuk. Másik lehetőség, hogy a találmány szerinti expressziós vektort tartalmazó gazdasejtet a TCR-V-régió DNS-transzkripció szintjének értékelése révén határozzuk meg, a TCR-specifikus V-régió mRNS transzkriptumot mérve a

gazdasejtben (pl. Northern-blot analízissel). Egy másik eljárás szerint a találmány szerinti expressziós vektort tartalmazó gazdasejtet DNS-DNS hibridizációval azonosíthatjuk a vektor TCR-V-régió kódoló szekvenciájával komplementer DNS-hibridizációs próbát használva.

A találmány szerinti DNS-szekvenciákat, expressziós vektorokét vagy DNS-molekulákét a technika állása szerint ismert különböző eljárásokkal lehet meghatározni. Ilyen pl. a Sanger-féle didezoxi láncterminációs módszer [Sanger és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467, (1977)].

A kitanításban leírt példákat követve, és a fent leírt detektálási módszerek közül egyet vagy többet alkalmazva a szakember felesleges kísérletezés nélkül, könnyedén kiválaszthatja az expressziós vektorok és gazdasejtek optimális TCR-V-régió-fehérje expressziós szintet adó kombinációját. Egy adott gazdasejt törzset egy adott, a találmány szerinti expressziós vektorral kombinálva, a teljes hosszúságú T-sejt-receptorfehérje relatíve magas szintű expresszióját érhetjük el. Előnyösen, a teljes hosszúságú TCR-V-régió-fehérje expressziós szintje legalább 300 mg/liter sejtkultúra. Ilyen szintű expressziót kaphatunk pl. egy előnyös megvalósítási módot alkalmazva, melyben a bakteriális gazdatörzs az *E. coli* SG21173, és a pKB-V β 5.3 az expressziós vektor (lásd a példákat, lent). A találmány szerinti expressziós vektor és a gazdatörzs ilyen kombinációi lehetővé teszik jelentős mennyiségű T-sejt-receptorfehérje előállítását, alacsonyabb költséggel mint az korábban lehetséges volt.

A találmány szerinti expresszált fehérjék a technika állása szerinti standard műveletekkel tisztíthatók, úgy mint ammónium-szulfát frakcionálás, affinitási kromatográfia, oszlopkromatográfia, gélelektroforézis és hasonlók. [lásd általánosan, Scopes, R, "Protein Purification", Springer-Verlag, USA (1982)]

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje oldható, ami alatt az értendő, hogy a T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje oldható vizes közegben. Egy oldható fehérjét általában az jellemez, hogy szobahőmérsékleten csupán nagy centripetális erő hatására (100 000*g) ülepszik vizes pufferben. Az oldhatóság különösen fontos annak érdekében, hogy a TCR-V-régió-fehérje az előállító sejtekből egyszerűen tisztítható legyen. A fehérjekémiában használatos vizes pufferek jellemző vegyületeikkel adott pH-t tartanak fent (jellemzően a pH=5 és pH=9 közötti fiziológiás tartományban), adott ionerősséget biztosítanak (jellemzően 10 mM és 500 mM között), és gyakran tartalmaznak proteáz inhibitorot és enyhe detergenst. Standard pufferekre példa a sós foszfát puffer, sós Tris-puffer, vagy bármelyik a fehérje-izolálásnál használatos számos puffer közül [lásd általánosságban: "Methods in Enzymology"; Mahler és Cordes, "Biological Chemistry", 2. kiad., Harper és Row, New York, USA (1966)]

A találmány szerinti megoldás a technika állása szerinti megoldástól eltérően alkalmas diagnosztikailag, terápiásan és vizsgálati célra hasznos mennyiségű TCR-V-régió-fehérje hatékony és gazdaságos előállítására. A TCR-

V-régió-fehérje nem fúziós fehérje, és nincs idegen szekvenciához, például affinitási kromatográfiához szükséges toldalékkal kötve.

A találmány szerinti TCR-V-régió-fehérjék alkalmaznak a T-sejt antigénreceptor szerkezeti és funkcionális vizsgálatára. Amellett, hogy a TCR-ek bizonyos formáinak szubsztrátjaként vagy kötő doménjeként szolgálnak, ezek a fehérjék konformációs vizsgálatok eszközei is lehetnek, pl. mivel hasonlítanak a T-sejt-receptor különböző részleteinek natív konformációjára.

T-sejt V-régió-fehérjék diagnosztikai próbákként is használhatók. A találmány egy speciális megvalósítási módja szerint a találmány szerinti TCR-V-régió-fehérjék bizonyos V-régió-alcsaládok jelenlétének vagy mennyiségének a meghatározására használhatók egy biológiai mintában. Egy ilyen mérési eljárást írt le Ritterhaus C. W. a WO92/08981-es számú, "Therapeutic and Diagnostic Methods Using Total Leucocyte Surface Antigens" című nemzetközi közzétételi iratban levő kitanításban. Mint ilyenek, a találmány tárgyát képezik eljárások, melyek alkalmasak immunológiai megbetegedések - mint például a szklerózis multiplex - diagnosztizálására, a betegséggel összefüggésben levő T-sejtek specifikus alcsaládjának detektálása révén.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány szerinti megoldás alkalmas jelentős mennyiségű T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje előállítására antitest termelés céljából. Az antitesteket számos, a technika állása szerint jól ismert módszerrel el lehet készíteni. Egy

monoklonális antitest (MAB) termeléséhez bármely módszer használható, amely lehetővé teszi antitest-molekulák előállítását folyamatos sejtvonal-kultúrákban. Ezek között a módszerek között szerepelnek, (de nem jelentik az egyedüli lehetőséget) a hibridóma technikák, melyeket eredetileg Kohler és Milstein írt le [Kohler és Milstein., Nature, 256, 495-497, (1975)]; az újabb emberi B-sejt hibridóma technika [Kozbor és mtsai., Immunology Today, 4, 72, (1983)]; az EBV technika [Cole és mtsai., "Monoclonal Antibody and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc. 77, (1985)]; valamint trauma technikák. Összefoglaló munkaként az antitestek előállításáról lásd: [Hartlaw, E., és mtsai., "Antibodies: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA, (1988)]

A találmány szerinti TCR-V-régió-fehérjék azon az alapon használhatók fel diagnosztikai reagensként, hogy képesek reagálni biológiai mintákban jelenlévő autoantitestekkel.

A találmány szerinti megoldás lehetővé teszi TCR-V-régió-fehérjék olyan jelzett származékainak előállítását is, melyeket megfelelő eszközökkel detektálni lehet, mint például a szcintillációs és Geiger-számlálók, vagy radiográfias film. Az ilyen származékok között szerepel pl. ^{125}I , ^{131}I , ^{14}C , ^{35}S , ^3H , ^{112}In ^{99}M , Tc és hasonlók, melyek alkalmasak *in vitro* és *in vivo* diagnosztikai használatra.

A fentiek szerint a találmány szerinti megoldás alkalmas immunológiai megbetegedések terápiás kezelésére. A leírásban használt értelemben az "immunológiai megbetege-

dés" kifejezés olyan betegséget jelöl, amelynek patogenezisében az immunrendszer szerepet kap, vagy melyben az immunrendszer megfelelő stimulálása a betegség megelőzését eredményezi. Ilyen betegségek pl. (de nem csupán ezek) az autoimmun betegségek, a neopláziás betegségek, különböző fertőző betegségek, a transzplantációs hiperszenzitivitás, a *graft versus host* betegség (az átültetett szövet reakciója a befogadó szervezettel szemben) és az idegrendszer degeneratív betegségei. Autoimmun betegségek pl. (de nem csupán ezek) az arthritis, mint pl. a rheumatoid arthritis, I. típusú diabétesz, fiatalkori diabétesz, szklerózis multiplex, autoimmun thyreoiditis (Hashimoto-féle thyreoiditis), myasthenia gravis, szisztémás lupus erythematosus (SLE), Sjörgen-szindróma, Graves-kór, Addison-kór, Goodpasturpe-szindróma, scleroderma, dermatomyositis, myxedema, polymyositis, vészes vérszegénység, gyulladáshos bélbetegség pl. Crohn-kór és autoimmun atrófiás gastritis, autoimmun hemolitikus vérszegénység. Neopláziás betegségek lehetnek a következő (de nem csupán azok): limfoproliferatív betegségek, mint pl. leukémiák, limfómák, non-Hodgkin-típusú limfóma és Hodgkin-típusú limfóma, valamint rákok, mint pl. emlőrák, vastagbél-rák, tüdőrák, májrák, hasnyálmirigy-rák, melanóma, vesekarcinóma stb. Fertőző betegségek lehetnek pl. (de nem csupán ezek) virális fertőzések, melyeket olyan vírusok okoznak, mint pl. a HIV, HSV, EBV, CMB, influenzavírus, hepatitisz-A, -B vagy -C-vírus; gombák okozta fertőzések, mint pl. amelyeket a *Candida* nemzetségbe tartozó élesztők okoznak; paraziták

okozta fertőzések, mint pl. amelyeket schistosoma-, filaria-, nematoda-, trichinosis- vagy protozoafajok (mint például a trypanosoma-félék melyek álmokórt, a plasmodium amely maláriát, a leishmania ami leishmaniosist) okoznak, bakteriális fertőzések, mint amelyeket pl. a mycobaktérium, corynebaktérium vagy staphylococcus okoznak. Hiperszenzitivitási betegségek például (de nem kizárólag) az I. típusú hiperszenzitivitások, melyek allergének hatására vezetnek allergiákhoz, és a II. típusú hiperszenzitivitások, pl. amelyek a Goodpasture-szindrómában és a myasthenia gravisban fordul elő.

A találmány szerinti TCR-V-régió-fehérjék terápiás használata azon a feltételezésen alapul, hogy összefüggés van egy specifikus immunrendszeri megbetegedés és egy meghatározott T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje preferált expressziója között, vagy egy TCR-V-régió-fehérjét kódoló meghatározott szekvencia expandált használata között. Bár a találmány szerinti megoldást nem szabad úgy tekinteni mint ami egy adott tudományos elméleten alapul, a TCR-V-régiók részbe azért hasznosak, mivel egy személy által adott immunválasz szabályzására használhatók. Specifikusan, ahol egy bizonyos V-régió jelenléte vagy abnormálisan magas expressziója korrelál egy bizonyos immunológiai megbetegedéssel, a beteg személy kezelése lehetséges a szóban forgó V-régió-fehérjét hordozó T-sejtek semlegesítése révén. Továbbá a TCR-V-régió-fehérjék szervezetbe juttatása befolyásolhatja az immunszuppresszív funkciókat azáltal, hogy stimulálja a szabályzó T-sejteket, melyek specifikusan köl-

csönhatnak a megcélzott V-régiót hordozó T-sejtekkel. Az is valószínű, hogy a TCR-V-régió-fehérje antitestet választhat, amely specifikusan kölcsönhat a megcélzott - a T-sejteken levő - V-régióval, és ez befolyásolja az immunválaszt.

A találmány szerinti teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjék különböző előnyöket jelentenek egy immunológiai betegség kezelésében. A találmány szerinti megoldástól eltérő megoldások a következő lehetőséget biztosították egy olyan immunológiai megbetegedés terápiás kezelésére, melyben T-sejtek specifikus szerepet játszanak: (a) a kezelés hiánya esetleges spontán felépüléssel; (b) kezelés peptidekkel, amelyek a T-sejt-antigénreceptor-V-régió különböző szegmenseinek felelnek meg; (c) nem specifikus kezelés, pl. szteroidokkal vagy nem-szteroid bázisú gyulladásgátló szerekkel. Azonban, ezek egyike sem nyújtotta a találmány szerinti megoldás sajátos előnyeit. A találmány szerinti terápiás eljárások azzal a megkülönböztetett előnnyel bírnak a technika állása szerinti immunológiai megbetegedések kezelésére alkalmazott eljárásokkal szemben, hogy a találmány szerinti eljárások csupán egy meghatározott TCR-V-régiót expresszáló meghatározott T-sejt alcsoportot céloznak meg, és így az éritett beteg személyek széles skálája esetében használhatók, mivel a találmány szerinti megoldás alkalmazása során nincs szükség arra, hogy egy adott személy MHC-haplotípusán alapuló meghatározott peptidet válasszunk ki. A találmány szerinti eljárás közelebb van ahhoz a célhoz, hogy csupán a betegség-

ben érintett T-sejtekre hassunk, miközben kihagyjuk vagy nem befolyásoljuk a többi, szóban forgó T-sejtet. Ezért a találmány szerinti megoldás nagyobb specifitású terápiát biztosít egy szélesebb populáció számára.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint egy teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje alkalmas lehet arra, hogy szabályzás révén csökkentse vagy eliminálja a T-sejtek egy olyan alcsoportját, amely ugyanazt a V-régiót hordozó TCR-t mutatja fel. A T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje terápiás esetben használható arra, hogy a megcélzott V-régiót hordozó T-sejtek aktivitását megváltoztassuk, vagy a megcélzott V-régiót hordozó T-sejtek aktív válaszra képes populációját válaszra képtelenné tegyük. Ebben az esetben a T-sejt-antigénreceptort valamely páciens kezelésére alkalmas terápiás szerként alkalmazzuk.

Egy adott betegséggel összefüggésbe hozható specifikus T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjék a technika állása szerint jól ismert különféle módszerek segítségével azonosítható. Myasthenia gravisban vagy szklerózis multiplaxben szenvedő betegek esetében Oksenberg, J. R. és munkatársai egy genetikai megközelítést írtak le [Oksenberg, J. R. és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 988-992, (1989)].

A leírásban használt értelemben a "kezelés" kifejezés magában foglalja a "megelőzés", "szuppresszió" vagy "kezelés" eseteit. A "megelőzés" magában foglalja védő hatású készítmény beadását a betegség kialakulása előtt. Így

pl. a kísérletes autoimmun enkefalomyelitisz (EAE) állati modelljében egy védő hatású készítmény sikeres beadása az enkefalitogén injektálása előtt - ami betegséget indukál - a betegség "megelőzését" eredményezte.

A "szuppresszió" azt jelenti, hogy a készítményt a betegség indukciója után, de klinikai megjelenése előtt adjuk be. Ismét az EAE példáját használva a védő hatású készítmény sikeres beadása az enkefalitogén injektálása után, de a neurológiai szimptómák megjelenése előtt a betegség "szuppresszióját" eredményezte.

A "kezelés" azt jelenti, hogy a védő hatású készítményt a betegség megjelenése után adjuk be. Az EAE példájában a védő hatású készítmény sikeres beadása az enkefalitogén injektálása és a klinikai jelek kialakulása után a betegség kezelését eredményezte.

A találmány szerinti TCR-V-régió-fehérje jótékony megelőző, szuppresszív vagy terápiás hatását mérendő, egyes klinikai mennyiségeket kell mérni. Ilyen például a limfociták proliferatív válasznak *in vitro* megváltozása. Az adott V-régió-fehérje terápiás előnyeinek mérésére szolgáló eljárások jól ismertek a technika állása szerint.

Állati modellrendszerek, melyek betegség kezelésében vagy ellene való védelemben szerepet játszó fehérjék hatékonyságának szkrínelésére használhatók a kereskedelemben hozzáférhetőek. Szisztémás lupus erythematosust (SLE) a betegségre fogékony egerekben tesztelték, mint azt Knight és mtsai., valamint Reinersten és mtsai. leírták [Knight és mtsai., J. Exp. Med., 147, 1653, (1978); Reinersten és

mtsai., 299, 515, (1978)]. Myasthenia gravist (MG) SLJ/J nőstény egerekben tesztelték a betegséget oldható AChR fehérjével indukálva, amely egy másik fajból származott [Lindstrom és mtsai., Adv. Immunol., 42, 233-284, (1988)] Arthritist egy fogékony egértörzsbbe II. típusú kollagén injekciójával indukáltak [Stuart és mtsai., Ann. Rev. Immunol., 42, 233-284, (1984)] Juvenilis arthritist fogékony patkányokba mycobakteriális hősokkfehérje injekciójával indukáltak [Van Eden és mtsai., Nature, 331, 171-173, (1988)]. Thyroiditist egerekben thyroglobulin beadásával indukáltak [Maron és mtsai., 152, 1115-1120, (1980)]. Inzulin-függő diabetes mellitus (IDDM) természetes módon előfordul, vagy indukálható bizonyos egértörzsekben, melyeket Kanasawa és mtsai. írtak le (1984). EA-egerekben és patkányokban az emberi MS modelljéül szolgál. Ebben a modellben a mielinburkot roncsoló betegséget mielin bázikus fehérje (MBP) beadásával indukálták [Paterson P. Y., "Textbook of Immunopathology", szerk.: Mischer és mtsai., Grune and Stratton, New York 179-213, (1986); McFarlin, D. E., és mtsai., Science, 179, 478-480, (1973); Satoh, J., és mtsai., J. Immunol. 138, 179-174, (1987)].

Természetesen ezek a fehérjék emberekben esetleg nem hatásosak, mivel lehet, hogy nem azonosak az emberi betegségben szerepet játszó TCR megfelelő helyével. Szakember számára érthető, hogy egy meghatározott állati modellben ismerttetett fehérjeszekvencia esetében módosítások lehetnek szükségesek, ha más fajokat - beleértve az embert is - akarunk kezelni.

A találmány szerinti fehérjék és készítmények, vagy funkcionális származékaik igen alkalmasak gyógyászati készítmények előállítására. A találmány szerinti gyógyászati készítményeket beadhatjuk bármely olyan élőlénynek, amely képes megtapasztalni a találmány szerinti készítmények jótékony hatását. A kezelni kívánt élőlények elsősorban emberek, az igényelt oltalmi kör azonban nem korlátozódik emberek kezelésére.

A találmány szerinti gyógyászati készítményeket bármely módon beadhatjuk, ami megfelel a kívánt célnak. A beadás történhet pl. parenterálisan, szubkután, intravénásan, intradermálisan, intramuszkulárisan, intraperitoneálisan, transzdermálisan vagy bukkális úton. Másik lehetőség, melyet egyidejűleg is alkalmazhatunk, a beadás esetleges orális útja. A fehérjék és gyógyászati készítmények beadhatók parenterálisan egyszeri injekcióval vagy hosszabb ideig tartó fokozatos perfúzióval.

A beadott dózis a befogadó korától, nemétől, egészségi állapotától, testsúlyától függ, valamint, ha fennáll, az egyéb kezelés fajtájától, a kezelés gyakoriságától és a kívánt hatás természetétől. A találmány szerinti készítmények beadásakor az adagoknak elegendően nagyoknak kell lenniük ahhoz, hogy a kívánt hatást kifejtsék, amely során pl. fehérjékre adott immunválasz - amit késleltetett típusú hiperszenzitivitással (DTH) mérhetünk - vagy antitesttermelés érhető el, és az immunológiai megbetegedést ezáltal jelentős mértékben megelőzhetjük, szuppresszálhatjuk vagy kezelhetjük. A dózisonak nem szabad olyan nagyoknak lennie, hogy

káros mellékhatásokat okozzon, mint pl. nem kívánt keresztreakciók, általános immunszuppresszió, anafilaktikus reakciók és hasonlók.

Emberben a dózis előnyösen 0,001 és 1 mg között van testsúlykilogrammonként.

A találmány szerinti fehérjéken kívül - amelyek önmagukban is gyógyászatilag aktívak - a gyógyászati készítmények tartalmazhatnak megfelelő gyógyászatilag elfogadható adalékanyagokat és kiegészítőket tartalmazó hordozót amely elősegíti az aktív vegyületek átalakítását gyógyászatilag használható készítményekké. A készítmények előnyösen tartalmaznak egy adjuvánst, mint pl. az alum, vagy más a technika állása szerint ismert adjuvánsokat [lásd pl. Warren és mtsai., Ann. Rev. Immunol., 4, 369-388, (1986); Chedid, L., Feder. Proc., 45, 2531-2560, (1986)].

A bioaktivitás vagy a célhoz juttatás elősegítése végett a fehérjét liposzómákba csomagolhatjuk, a technika állása szerinti módszereket és vegyületeket alkalmazva.

Azok a készítmények, amelyek tablettá vagy kapszula formájában orálisan beadhatók, illetve azok, amelyek rektálisan adhatók be, mint például a végbélkúpok, valamint azok, amelyek injekcióhoz, vagy orális bejuttatáshoz készített oldat formájában vannak, körülbelül 0,001% és kb. 99% közötti arányban tartalmaznak aktív vegyülete(ke)t, előnyösen pedig kb. 0,01% és kb. 95% között, az adalékanyagokkal együtt.

Alkalmas expiciensek, különösen töltelékanyagok, úgy mint szacharidok pl. laktóz vagy szacharóz, mannitol

vagy szorbitol cellulóz készítmények és/vagy kalcium-foszfátok pl. trikálcium-foszfát vagy kalcium-hidrogén-foszfát, valamint kötőanyagok, mint pl. keményítőpaszta, melyhez használhatunk kukoricakeményítőt, gabonakeményítőt, rizskeményítőt, burgonyakeményítőt, zselatint, tragacantumot, metilcellulózt, hidroxipropil-metilcellulózt, nátrium-karboximetil-cellulózt és/vagy polivinil-pirrolidont.

Egyéb orálisan beadható gyógyászati készítmények lehetnek pl. zselatinból készült összeillesztett kapszulák, valamint lágy, tömített kapszulák, melyek szintén zselatinból készültek, de lágyítószerrel, pl. glicerin vagy szorbitol segítségével. Az összeillesztett kapszulák az aktív vegyületeket szemcsék formájában tartalmazhatják, melyeket töltelékanyagokkal, pl. laktózzal, kötőanyagokkal, pl. keményítővel, és kenőanyagokkal, pl. talkummal vagy magnézium-sztearáttal és adott esetben stabilizálószerrel keverhetünk össze. A lágy kapszulákban az aktív vegyületek előnyösen alkalmas folyadékban vannak feloldva vagy szuszpendálva. Ilyen folyadékok lehetnek zsírsavak vagy folyékony paraffin. Ezekhez stabilizálószerrel adhatunk.

Lehetséges gyógyászati készítmények, melyeket rektálisan adhatunk be, lehetnek pl. végbélkúpok, amelyek egy vagy több aktív vegyületet tartalmaznak a kúp alapanyagán kívül. Megfelelő kúpalapanyagok pl. a természetes vagy szintetikus trigliceridek, vagy paraffin szénhidrogének. Ezenkívül rektális zselatinkapszulák használata is lehetséges, melyek az aktív vegyületek és egy alapanyag kombinációi. Lehetséges alapanyagok lehetnek pl. folyékony

trigliceridek, polietilén-glikolok, vagy paraffin szénhidrogének.

A parenterális beadásra alkalmas formák pl. vízben oldhatóvá tett (pl. vízben oldható sók formájában) fehérjék vizes oldatai, valamint fehérjeszuszpenziók, amik pl. megfelelő olajinjekció szuszpenziók lehetnek. Alkalmas lipofil oldószeres vagy hordozók lehetnek zsírsav-olajok, pl. szeszamóolaj, vagy szintetikus zsírsav-észterek, pl. etil-oleát vagy trigliceridek. Vizes injekció szuszpenziók tartalmazhatnak viszkozitásnövelő anyagokat, pl. nátriumkarboximetil-cellulózt, szorbitolt és/vagy dextránt. Adott esetben a szuszpenzió stabilizálószereket is tartalmazhat.

A fehérjét injekcióban való beadás céljából hagyományos, gyógyászatiilag elfogadható parenterális hordozók segítségével formulázzuk. Ezek a hordozók nem toxikusak, terápiás célra alkalmasak és számos gyógyszerformulázási lehetőség meg van adva a "Remington's Pharmaceutical Sciences"-ben [szerk.: Martin, E. W., Mack Publishing Co, Easton PA, USA (1990)]. Példák korlátlanul használható adalékanyagokra. a víz, sós oldat, Ringer-oldat, szőlőcukor-oldat és Hank-féle kiegyensúlyozott sóoldat. A találmány szerinti formulázás tartalmazhat kis mennyiségű adalékanyagot, mint pl. izotóniát, fiziológiás pH-t és stabilitást fenntartó anyagokat. A találmány szerinti fehérjét előnyösen tisztított formában, lényegében aggregátumok és más fehérjék távollétében formulázzuk, előnyösen kb. 10 ng/ml és 100 mg/ml közötti koncentrációban.

A találmány szerinti fehérjék hatásos adagjai, melyek egy immunológiai megbetegedés megelőzésére, szuppressziójára vagy kezelésére használhatók, kb. 1 ng és 100 mg között vannak testsúlykilogrammonként. Előnyösen az adag kb. 10 ng és 10 mg között van testsúlykilogrammonként. Előnyösebben az adag kb. 100 ng és 1 mg között van testsúlykilogrammonként.

A technika állása szerint ismertek eljárások a fehérjék hatékonyságának növelésére. Ezek a technikák a találmány szerinti fehérjék esetében is alkalmazhatók lehetnek. Az alábbi példákat a találmány szerinti megoldás illusztrálása érdekében ismertetjük, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertetettekre korlátoznánk.

Az alábbi általános technikákat az alábbi példákban bemutatott kísérletekben számos esetben alkalmaztuk.

1. ÁLTALÁNOS ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

a. Baktériumtörzsek, plazmidok és általános módszerek

Az *Escherichia coli* GM2929, egy metiláz-negatív törzs, és az *E. coli* LJ24-törzs (*lac*-deléció) [Rasmussen és mtsai., J. Bacteriology, 173, 6390 (1991)] Dr. Martin Marinus (University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA., USA) ajándéka volt. Az *E. coli* JM109-törzset [Yanisch-Perron és mtsai., Gene, 33, 103, (1985)] a Promega cégtől szereztük be (Madison, WI, USA; a zárójelbe tett cégnevek a továbbiakban a beszerzés forrását jelölik). A BL21 (*lon*⁻, *ompT*⁻) törzset [Wood, W. B., J. Mol. Biol., 16, 118-133, (1966); Studier és Moffatt, J Mol. Biol., 189, 113-130, (1986)] a Novagen (Madison, WI, USA) cégtől sze-

reztük be. SG22094 (*lon⁻, clp⁻*), SG21163 (*lon⁻, htpr⁻*) és SG21173 (*lon⁻, htpr⁻, clp⁻*) Dr. Susan Gottesman (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) ajándéka volt. Ezek a Gottesmantól származó törzsek hiányosak a *lacI*-génben. A baktériumsejteket Morrison módszerével tettük kompetensekké [Morrison, Meth. Enzymology, 68, 326-331, (1979)], vagy a GibcoBRL cégtől (Gaithersberg, MD, USA) szereztük be (DH5 α)

A pKK233-2-plazmidot (Amann és Brosius, Gene, 40, 183-190, (1985)) a Pharmacia (Piscataway, NJ, USA) cégtől szereztük be. A pBR322-plazmidot [Bolivar és mtsai, Gene, 2, 95-113, (1977)] a New England Biolabs (Beverly, MA, USA) cégtől szereztük be. A pBluescriptIIKS⁺ (Alting-Mees és mtsai, Meth. Enzymology, 216, 483-495, (1992)) a Stratagene (La Jolla, CA, USA) cégtől szereztük be. A pDC952-plazmidot, amely az *argU* (*dnaY*) gént tartalmazza (Lindsey és mtsai, J. Bacteriology, 171, 6197-6205 (1989)) Dr. James R. Walker (University of Texas, Austin, TX, USA) ajándéka volt. A pSE420 (Brosius, Meth. Enzymology, 216, 469-483, (1992)) és a pKK480-3 [Brosius, (1992) ld. fent] Dr. Jürgen Brosius (Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA) ajándéka volt. A pUCTs-plazmidot (Bukrinsky és mtsai, Gene, 70, 415-417, (1998)) Michail I. Bukrinskytól szereztük be Jürgen Brosiuson keresztül.

A plazmidkonstrukciókat standard eljárásokkal állítottuk elő [Sambrook és mtsai., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA (1982)]. A DNS restrikciós és modifiká-

ciós enzimeket a New England Biolabs-től szereztük be, (hacsak másképpen nem jelezzük), és a gyártó előírásai alapján használtuk fel. A szintetikus oligonukleotidokat az Operon Technologies, Inc., (Alameda, CA USA) cégtől szereztük be, hacsak másként nem jelezzük.

Az oligonukleotidok hőkezelését úgy végeztük, hogy a komplementer oligonukleotidokat ekvimoláris mennyiségben összekevertük, 10 mM Tris-pufferben, pH 8.0, 0,5 mM MgCl₂ és 5 percig 100 °C-on tartottuk, majd lassan 25 °C-ra hűtöttük le. A polimeráz láncreakciót PCR-t egy "Perkin-Elmer Cetus DNA Thermal Cycler" készülékben hajtottuk végre, a "GeneAmp" reagenskészletet (The Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA) alkalmazva [Saiki és mtsai., Science, 239, 487-491, (1988)]. A DNS szekvenálást a Sanger-féle didezoxi-nukleotid láncterminációs eljárással végeztük [Sanger és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467, (1977)] a "Sequenase"-kit (U. S. Biochemical Cleveland, OH, USA) segítségével. Minden vegyszer a lehető legnagyobb tisztaságú volt, amit kereskedelmi forgalomba kapni lehet.

b. Sejtkultúrák növesztése és indukciója

A kémiaailag indukált kultúrák esetében fagyasztott glicerines kultúrákból oltottunk le 5-25 ml 2XYT-tápközegbe (16 g "Bacto-Tryptone" (Difco 0123), 10 g "Bacto-Yeast Extract" (Difco 0127), 10 g NaCl, pH 7,2-7,4, 1 liter vízben), ami 6 µg/ml tetraciklint tartalmazott, a sejteket másnapig nőni hagytuk (37 °C, 280 ford/perc). Jellemzően az éjszakán át növesztett kultúrát 1/100 térfogatarányban

használtuk, hogy leoltsunk kettő 125 ml-es üvegbe, amelyek 25 ml 2XYT-táptalajt és 6 µg/ml tetraciklint tartalmaztak. A kultúrákat 37 °C-on inkubáltuk 280 ford/perc fordulatszámra rázatva, amíg abszorbanciája 580 nm-en 0,5-1,0 egység nem lett, és ezután 1 mM izopropil-β-D-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) indukáltunk, majd további két órát nőni hagytuk a sejteket.

A hőmérsékletemeléssel indukált kultúrák esetében a sejteket 30 °C-on növesztettük 280 ford/perc-cel rázatva, amíg abszorbanciájuk 580 nm-en mérve el nem érte a 0,5-1,0 egységet ($A_{580} = 0.5-1.0$). Ezután az egyik kultúrát 30 °C-on tartottuk, míg a másikat 42 °C-os vízfürdőbe helyeztük át, így indukálva azt, majd további két órán keresztül, nőni hagytuk a sejteket. Egy másik esetben a kultúrát úgy indukáltuk, hogy 30 °C-on 0,3-0,6 abszorbancia egységig ($A_{580} = 0,3-0,6$) hagytuk nőni a sejteket (580 nm-en mérve), majd két egyenlő részre osztottuk a kultúrát. Az egyiket 30 °C-on tartottuk, a másikat 42 °C-on növesztettük.

Az indukció eredményének mérése érdekében olyan dupla mintákat vettünk, melyek megfeleltek 1 ml $A_{580} = 1,0$ egységnyi optikai sűrűségű mintának, (tegyük fel pl., hogy $A_{580} = 3,0$, ebben az esetben 333 µl kultúrát vettünk ki mintaként). A mintákat egy Eppendorf-mikrocentrifugában 14000*g-vel 1 percig centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk, és a lecentrifugált sejteket -20 °C-on tároltuk.

c. Stabilitási vizsgálatok

A baktériumokat kilemezeltek, hogy különálló telepeket kapjunk három egymást követő alkalommal, és egy kü-

lönálló telepet a 3. lemezről átoltottunk 200 ml 2XYT-táptalajba, amely 6 µg/ml tetraciklint tartalmazott. A kultúrát $A_{580} = 0,5-1,0$ abszorbancia egységig növesztettük 60 ml-t kivettünk belőle, hozzáadtunk 40 ml glicerint és 1 ml-es adagokban 100 falé szétosztottuk és $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A kultúra maradék részét két egyenlő részre osztottuk. Az egyiket indukálás nélkül inkubáltuk, míg a másikat IPTG hozzáadásával vagy hőmérsékletemeléssel indukáltuk. Mindkét kultúrát további két órán keresztül nőni hagytuk. Az 1 ml-es mintáknak megfelelő mintákat vettünk $A_{580} = 1,0$ abszorbancia egységnél, az indukció előtt, és két órával utána is. A mintákat ezután megmértük a minták abszorbanciáját 580 nm-en, pH-jukat EIA segítségével a fehérjetermelést, valamint akrilamid gélelektroforézisnek és Western-blotolásnak vetettük alá.

A fagyasztott minták közül hármát teszteltünk párhuzamosan baktériumsejt-szaporodás és fehérjetermelés szempontjából. Mindegyikükkel (1 ml térfogattal) beoltottuk 200 ml 6 µg/ml tetraciklint tartalmazó 2XYT-táptalajt, és $A_{580} = 0.5 - 1.0$ egységig növesztettük a sejteket. Ezután minden kultúrát két részre osztottunk, az egyiket indukálatlanul inkubáltuk, a másikat kémiaailag, vagy hőmérsékletemelés révén indukáltuk. Mindkét kultúrából 1 ml $A_{580} = 1.0$ egységnyi optikai sűrűségű mintának megfelelő mintákat vettünk indukálás előtt és 2 órával utána, és a fent leírtak szerint megmértük őket.

A stabilitási vizsgálatokhoz 1 ml alikvot-részt vettünk ki indukálás előtt a három párhuzamos kultúra

egyikéből 1/1000 arányban meghígítottuk 2XYT-táptalajjal, és 20 μ l-t vagy 200 μ l-t beoltottunk 200 ml tetraciklint tartalmazó 2XYT-táptalajba és $A_{580} = 0.5-1.0$ abszorbancia egységig növesztettük a sejteket. Ezután a kultúrát két alikvot-részre osztottuk az egyiket indukáltuk, és mindkettőt további két órán keresztül inkubáltuk. 1 ml $A_{580} = 1.0$ egységnyi optikai sűrűségű mintának megfelelő mintákat vettünk indukálás előtt és 2 órával utána, és a fent leírtak szerint megmértük őket.

d. Sejtfractionálás

A sejteket elektroforézis előtt 7000*g-vel 7 percen keresztül centrifugáltuk, a felülúszót (a táptalajt) újra lecentrifugáltuk (14000*g, 5 perc). A sejteket felfuszpendáltuk 20% (w/v) szacharózt, és 1 mM EDTA-t tartalmazó, pH 8.0 0,3 M Tris-HCl-pufferben, 25 °C-on 15 percig inkubáltuk, majd 7000*g-vel 7 percig centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, és a periplazmában lokalizált fehérjét ozmotikus sokkal felszabadítottuk [Nossal és Heppel, J. Biol. Chem., 241 3055-3062, (1966)] által, hogy felfuszpendáltuk az eredeti térfogat 1/5-e térfogatú hideg vízben, és tíz percig 0 °C-on inkubáltuk. 9000*g-vel való 10 perces centrifugálás után a felülúszót (periplazma frakció) félretettük, a sejteket felfuszpendáltuk 1X TST-ben (pH 8,0 25 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 ml/liter Tween 20) szonikáltuk 12000*g-vel 15 percig centrifugáltuk és a felülúszót félretettük (szolubilis citoszol frakció).

e. Poliakrilamid-gélelektroforézis

A lecentrifugált, lefagyasztott *E. coli* sejteket felszuszpendáltuk 70 µl vízben, élénk vortexeléssel, vagy szonikálással (Sonic Dismembrator, Model 301, ARTEC Systems Corporation) 0 °C-on 5 másodpercig 0,4 teljesítmény outputtal, ezt háromszor ismételve. A feltárt sejteket összekevertük 70 µl 2X mintapufferrel (pH 6.8 125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerin, 10% β-merkaptoetanol, 0.002% brómfenolkék) [Laemmli, Nature, 227, 680-685, (1970)]. A mintákat 100 °C-on 5 percig inkubáltuk, 14000*g-vel 30 másodpercig centrifugáltuk, és belőlük 10-15 µl-t felvittünk egy készen vásárolt 16%-os vagy 10-20%-os akrilamid "Tricine" gélre (Novex, San Diego, CA, USA), és megfuttattuk egy ugyanattól a gyártótól vásárolt futtatópufferben. Az elektroforézist 125 V állandó feszültségnél, vagy 45 mA állandó áramerősségnél végeztük (két gélre számítva) kb. két órán keresztül, amíg a brómfenolkék festék ki nem futott a gélből. Előre megfestett kis molekulásúlyú fehérje-standardokat (No. SE130024, Integrated Separation Systems, Natick, MA, USA) használtunk markerként, 1µl-t sávonként. A géleket másnapig festettük 10% ecetsavat, 25% metanolt és 0,025% "Coomassie Brilliant Blue R"-t tartalmazó festékkel.

f. Western blot analízis

SDS-PAGE segítségével végzett elválasztás után a fehérjéket immunológiai módszerrel detektáltuk [Towbin és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 4350-4354 (1979)] elektrotranszferrel polivinilidén-difluorid (PVDF) membránokra (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA, USA) vive át

őket, "Semi-Dry" elektroblotoló készülék (Integrated Separation Systems) segítségével. A fehérjetranszferet 10 mA/cm áramsűrűséggel 1-3 órán keresztül végeztük, és a membránokat másnapig blokkoló pufferben (1X PBS, 2% száraz tejpor, 0,1% Tween-20) áztatva blokkoltuk.

A membránokat háromszor mostuk, 5-5 percig 0,1% Tween-20-at tartalmazó 1X PBS-ben, majd újabb három alkalommal 5-5 percig 1X PBS-ben, majd tormaperoxidázzal (HRP) konjugált monoklonális anti-V β 5.3 antitest (13A2-HRP) 0,25 mg/ml-es oldatának 0,1% Tween-20-at tartalmazó 1X PBS-sel 1/3000 arányban hígított oldatába áztattuk be őket. Két órás gyengéd himbálást követően a membránokat a fenti módon mostuk, majd a fehérjéket megnövelt kemilumineszcenciájú mérési eljárással ("Enhanced Chemiluminescence assay", Amersham, Arlington Heights, IL, USA), melyet a gyártó cég utasításai alapján alkalmaztunk. A filmet 5 s és 60 s közötti időtartamig exponáltuk.

g. Enzimek felhasználásán alapuló immunológiai mérési eljárás ("Enzyme immunoassay")

A lefagyasztott, lecentrifugált sejteket 20 μ l 8 M karbamidot tartalmazó pH 8.5 50 mM Tris-HCl-ban felfuszpendáltuk [Marston és Hartley, Meth. Enzymol, 182, 264-276, (1990)], és a V β 5.3 mennyiségét enzimek felhasználásán alapuló immunológiai mérési eljárással meghatároztuk a következőképpen:

"Nunc Immuno Maxisorp" lemezeket (VWR No.62409-002) 100 μ l/mélyedés 4C2 IgG-vel (4 μ g/ml PBS-ben) burkoltuk,

és másnapig 4 °C-on tartottuk. A burkoló oldatot eltávolítottuk, és 200 µl/mélyedés blokkoló puffert (0,05% Tween-20-at és 1%-os kazein hidrolizátumot tartalmazó PBS-t) tettünk fel a lemezre. A lemezeket 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, 150 ford/perc-cel rázattuk, majd háromszor mostuk mosópufferrel (0,05% Tween-20-at tartalmazó PBS). Az - 1/2000 és 1/32000 közötti arányban hígított - mintákból és a Vβ5.3 standardokból 100 µl-t tettünk fel a lemezre mélyedésenként, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk 90 percig, 150 ford/perc-cel rázatva. A lemezeket háromszor mostuk mosópufferrel, majd 5% magzati borjúsérumot tartalmazó blokkoló pufferrel 1/5000 arányban hígított HRP-konjugált anti-Vβ5.3 monoklonális antitestet (13A2-HRP) adtunk a lemezhez, 100 µl-t minden mélyedésbe (0.5 µg/ml). A lemezeket 90 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, 150 ford/perc-cel rázatva, négyszer mostuk, és 100 µl/mélyedés o-feniléndiamin (OPD) szubsztrátot adtunk az elegyhez. A reakciót 30 perc múlva mélyedésenként 50 µl 2 N H₂SO₄ hozzáadásával leállítottuk. Az abszorbanciát 490 nm-en mértük meg, a 650 nm-en mért háttérrel levonva. A referenciaként használt mélyedések nem tartalmaztak mintát.

2. A PLAZMIDOK ELKÉSZÍTÉSE

1. példa

A pK2D elkészítése

A találmány szerinti T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjék expresszáltatásának kiindulópontja egy olyan plazmid elkészítése volt, amely a T-sejt-antigénreceptor-V-

régió-fehérje természetes expressziós regulációs elemeit tartalmazta. Ezek az elemek a promóter, a két transzkripciós terminációs hely és egy replikációs origó a baktériumban való stabil replikáció végett. Egy terápiás célból *in vivo* alkalmazásra szánt fehérje gyártásával kapcsolatos hatósági megkötéseket figyelembe véve a tetraciklin-rezisztenciagént választottuk ki a plazmidot hordozó sejtek szelektálásának lehetővé tételére. Végül a kiindulási expressziós vektorhoz szükség volt egy többszörös klónozóhelyre, hogy stratégiai megfontolásokból megkönnyítésül a találmány szerinti előnyös kódoló régiók expressziós vektorba történő klónozását. A találmány szerinti egyetlen kiindulási plazmidot a következő példa írja le.

Az előnyös expressziós vektor elkészítésének kiindulópontja a lent leírt pKK233-2 (4.6 kb) volt. Az *Nco*I-helyet *Spe*I-hellyé alakítottuk át a következőképpen: a pKK233-2-t *Nco*I-el megemésztettük, és keletkezett túlnyúló 5'-véget "mung bean" nukleázzal 25 °C-on 30 percig inkubálva leemésztettük. A plazmidot fenol-kloroform eleggyel kétszer extraháltuk, etanollal kicsaptuk 2 M ammónium-acetát jelenlétében majd vízben újraszuszpendáltuk. Bakteriális alkalikus foszfáttal (forgalmazza a GibcoBRL) történt defoszforilálást követően a vektort egy szintetikus *Spe*I-linkerhez (No. 1085, New England Biolabs) ligáltuk, majd a ligáló eleggyel DH5 α sejteket transzformáltunk, ezáltal a pKK233-2A vektort nyerve.

Ezután a tetraciklin gént állítottuk helyre a következőképpen: a pKK233-2a-plazmidot *Eco*RI-gyel és *Sal*I-

gyel megemésztettük, ami két fragmenst, egy 279 bp és egy 4321 bp hosszút eredményezett. A két fragmenst agaróz-gél-elektroforézissel választottuk el, és a nagyobb fragmenst az agarózgélből tisztítottuk meg a "Geneclean" reagenskészlet (forgalmazza a BIO 101, La Jolla, CA, USA) segítségével. A tetraciklin gén egy 651 bp-nyi aminoterminális fragmensét hasítottuk ki *EcoRI*-gyel és *SalI*-gyel, pBR322-plazmidból, és a pKK233-3A 4321 bp hosszú fragmenséhez ligáltuk. A kapott plazmid, a pK2B, tetraciklin-rezisztenciát kölcsönzött az *E. coli* DH5 α sejteknek. A plazmidot azáltal, hogy a β -laktamázgén egy részét deletáltuk, és a *HindIII*-helyet *SacI*-hellyé alakítottuk át a következőképpen:

A DNS-szegmenst, amely az egyetlen *SpeI*-helytől a transzkripciós terminációs helyek 3' végéig tart, a pK2B-t templátként használva PCR-rel megszintetizáltuk. Az 5' "szensz" láncindító tartalmazta az *SpeI*, *PstI* és *SacI* restrikciós hasítási helyeket, 5'-3'-irányban (a szekvenciában aláhúzva):

5' - TATAATGACTAGTCGCTGCAGCCAACCGGGCTG - 3' [A szekvencialistában az 1. azonosítószámon megadott szekvencia]

A 3' "antiszensz" láncindító a *ScaI*-helyet tartalmazta (aláhúzva):

5' - GTCCTAGAGTACTGAGCGGATAC - 3' [A szekvencialistában az 2. azonosítószámon megadott szekvencia]

1 ng pK2B DNS templátot adtunk hozzá a következő reakcióelegyhez: pH8.3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 100 μ g/ml zselatin, 200 μ M minden egyes dezoxinukleotidból, (dATP,

dCTP, dGTP, dTTP), 1 μ M mindegyik láncindítóból, és 2.5 egység "AmpliTaq" DNS polimeráz. A végső reakciótérfogat 100 μ l volt, melyet 100 μ l nujollal fedtünk le. A DNS-t 95 °C-on, 2 percig denaturáltuk, 60 °C-on 1 percig hőkezeltük, és 1 percig 72 °C-on tartottuk a láncindítók meghosszabbítása végett. Az amplifikált DNS-t 1%-os agarózgélben analizáltuk, pH 7,8, 40 mM Tris-HCl-ban, amely 5 mM nátrium-acetátot, és 1 mM EDTA-t tartalmazott.

A kapott 485 kb hosszúságú PCR-szintetizált fragmenst *SpeI*-gyel és *ScaI*-gyel megemésztettük, majd a 4129 bp hosszú fragmenshez ligáltuk, melyet a pK2B *SpeI*-gyel és *ScaI*-gyel történt emésztésével nyertünk. Az így kapott plazmid a pK2C volt.

A pK2C-plazmidot (4,6 kb) tovább módosítottuk, hogy többszörös klónozóhelyet tartalmazzon. Először is a pK2C-plazmidot megemésztettük *SpeI*-gyel és *ScaI*-gyel, és egy kettős szálú szintetikus oligonukleotiddal ligáltuk, amely 15 restrikiós helyet tartalmazott. Ezt a többszörös klónozóhelyet két komplementer szintetikus oligonukleotid ekvimoláris koncentrációjú elegyének hőkezelésével alakítottuk ki. A két sorrendben 91 és 97 bp hosszú oligonukleotid szekvenciája a következő volt:

5' - GGCTCGAGCCTAGGCTGCAGCCCGGGCGCGCGCGGCCGAGGCC
TTAATTAAGAGCTCCGGACCGCACAATGTGGGCGGCCCTTAAGA - 3'

[A szekvencialistában az 3. azonosítószámon megadott szekvencia]

5' - CTAGTCTTAAGGGCGCGCCACATTGTGCGGTCCGGAGCTCTTAA

TTAAAGGCCTGCGGCCGCGCGCGCCCCGGGCTGCAGCCTAGGCTCGAG

CCGC - 3'

[A szekvencialistában az 4. azonosítószámon megadott szekvencia]

A többszörös klónozóhely a következő restrikciós hasítóhelyeket kódolja: *SpeI*, *AflIII*, *AscI*, *DraIII*, *Rsr*, *SacI*, *PacI*, *StuI*, *NotI*, *BssHII*, *XmaI*, *PstI*, *AvrII*, *XhoI*, *SacII*. A ligálóeleggyel a metilázhiányos *E. coli* GM2929 törzset transzformáltuk. A kapott plazmidot (4,67 kb) részlegesen megszekvenáltuk, hogy meggyőződjünk az in vitro szintetizált régiók épségéről.

Eredmények

A kiindulási plazmid a pKK233-2 volt, amely a következő elemeket tartalmazta: a *trc*-promótert [Brosius és mtsai, ld. fent (1985)], amely a *tac*-promóterhez hasonlóan a *lacUV5*-promóter -10 régiójának a triptofánpromóter [de Boer és mtsai., ld. fent (1983); Amann és mtsai, lásd fent (1983)] -35 régiójával való fúziójából származik. A plazmid egy riboszómakötőhelyet is tartalmaz, melyet egy három restrikciós hasítási helyből (*NcoI*, *HindIII*, *PstI*) álló klónozóhely követ. Ezután az *E. coli rrnB* riboszómális RNS operonjának transzkripció terminátorai következnek [Brosius és mtsai, Plasmid, 6,112-118, (1981)]. Ezenkívül a pKK233-2 tartalmazza az ampicillin-rezisztenciát biztosító β -laktamáz-gént, a pBR322 replikációs origóját és a tetraciklin-rezisztenciagén egy kis, nem funkcionális régióját.

A pKK233-2-t az *Nco*I-hely elrontása érdekében módosítottuk, helyreállítottuk a tetraciklin-rezisztenciagént, a β -laktamáz-gén kódoló régiójának egy szegmensét deletáltuk, (ezzel inaktiválva a gént), majd egy 15 restrikciós hasítási helyet tartalmazó többszörös klónozóhelyet inszertáltunk, a pK2D-plazmidhoz jutva így.

2. példa

A pK2D-plazmidon további módosításokat hajtottunk végre, az *Erwinia carotovora*ból származó [Lei és mtsai., J. Bacteriology, 169, 4379-4383, (1987)] pelB-szignálszekvenciát, vagy az *Escherichia coli*ból származó hőstabil enterotoxin-II (STII) szignálszekvenciáját [Morioka-Fujimoto és mtsai, J. Biol. Chem., 266, 1728-1732, (1991)] építve be.

A pK-pelB elkészítése

A pK2D-plazmidot (4,67 kb) úgy alakítottuk át, hogy tartalmazzon egy riboszómakötő-helyet [Shine és Dalgarno, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 1342-1346, (1974); Shine és Dalgarno, Nature, 254, 34-38, (1975); Steitz és Jakes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 4734-4738 (1975)], és az *Erwinia carotovora*ból származó [Lei és mtsai., J. Bacteriology, 169, 4379-4383, (1987)] pelB-szignálszekvenciát. Ezzel a pK-pelB-plazmidot (4,74 kb) állítottuk elő az alábbiakban leírtak szerint:

A pK2D-t *Spe*I-gyel és *Sac*I-gyel a többszörös hasítási helyen elhasítottuk, majd a vektort két, sorrendben 103 és 95 bp hosszú komplementer szintetikus oligonukleotiddal ligáltuk, melyek szekvenciáját az alábbi-

akban mutatjuk be. Egy csendes mutációt (melyet kisbetűvel jelöltünk) építettünk be a *pelB*-szekvenciába, hogy egy - a szekvenciában aláhúzással jelölt - *NcoI* restrikciós hasítóhelyet építsünk ki, ezzel elősegítve a $V\beta 5.3$ -gén későbbi szubklónozását.

5' - CTAGTAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACC
TATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCCGGCCA
GCCATGGCCGAGCT - 3'

[A szekvencialistában az 5. azonosítószámon megadott szekvencia]

5' - CGGCCATgGCTGGTTGGGCACGAGTAATAACAATCCAGCGGCT
GCCGTAGGCAATAAGGTATTTTATTATGACTGTCTCCTTGAAATAGA
ATTTA - 3'

[A szekvencialistában az 6. azonosítószámon megadott szekvencia]

A pK-STII elkészítése

A pK2D-plazmidot úgy módosítottuk, hogy tartalmazzon egy riboszómakötő-helyet és az *E. coli* hőstabil enterotoxinjának (STII) szignálszekvenciáját [Morioka-Fujimoto és mtsai., ld. fent (1991)], a következők szerint:

A pK2D-t a többszörös klónozóhely *SpeI* és *DraIII* hasítóhelyén a megfelelő restrikciós endonukleázzal elhasítottuk, majd a vektort két, sorrendben 105 és 98 bp hosszú komplementer szintetikus oligonukleotiddal ligáltuk, melyek szekvenciáját az alábbiakban mutatjuk be Két (kisbetűkkel jelzett) csendes mutációt építettünk be az STII szekvenciába, hogy *MluI* és *DraIII* restrikciós hasítóhelyeket építsünk



ki (aláhúzással jelölve), hogy elősegítsük a V β 5.3 későbbi szubklónozását.

5' - CTAGTAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAAAAGAA
TATAGCATTCTACTAGCTTCAATGTTTCGTCTTCTCTATTGCAACTA
ACGCgTACGCaCATT - 3'

[A szekvencialistában az 7. azonosítószámon megadott szekvencia]

5' - GtGCGTAcGCGTTAGTTGCAATAGAGAAGACGAACATTGAAGCT
AGTAGGAATGCTATATTCTTTTTTCATTATGACTGTCTCCTTGAAATA
GAATTTA - 3'

[A szekvencialistában az 8. azonosítószámon megadott szekvencia]

3. példa

A fenti 2. példa szerinti, szignálszekvenciát tartalmazó plazmidokat tovább módosítottuk, hogy két szabályzó elemet is tartalmazzanak.

A pKT-pelB elkészítése

A pK-pelB-plazmidot tovább módosítottuk olyan irányban, hogy két szabályzó elemet is tartalmazzon a pelB-vezetőszekvenciától 5'-irányban, ezzel a pKT-pelB-t alkotva (4,8 kb). Ezek az elemek a T7 bakteriofág 10-es génjének (g10) transzlációs enhanszere, és egy 8 aminosavat kódoló mini-cisztron: ATG TAT CGA TTA AAT AAG GAG GAA TAA [A szekvencialistában az 28. azonosítószámon megadott szekvencia]. A két szabályzó elemet úgy inszertáltuk, hogy a pK2D-t az SpeI- és a SacI-helyen elhasítottuk, majd a g10 szekvenciát, a riboszómakötő-helyet, a mini-cisztront és a

pelB-szignálszekvenciát kódoló szintetikus oligonukleotidokat a vektorba ligáltuk, 5'-3'-irányban. Az oligonukleotidokat 71 bp és 89 bp közötti hosszúságú oligonukleotidok két egymást kiegészítő készleteként szintetizáltuk meg úgy, hogy az oligonukleotid-párok közötti 9 bp hosszú túlnyúló komplementer szakaszok révén lehessen őket összeligálni. A két megtervezett komplementer oligonukleotid pár az A pár (a sorrenben 89 bp és 76 bp hosszú J5A és J6A oligókból áll) és a B pár (a sorrenben 71 bp és 76 bp hosszú J5B és J6B oligókból áll), szekvenciájuk pedig a következő:

J5A

5' - CTAGTCCGGAATTGGGCATCGATTAACCTTTATTATTAATAAATTA
AGAGGTATATATTAATGTATCGATTAAATAAGGAGGAATAAATA - 3'

[A szekvencialistában az 9. azonosítószámon megadott szekvencia]

J6A

5' - CTCCTTATTTAATCGATACATTAATATATACCTCTTTAATTTTA
ATAATAAAGTTAATCGATGCCCAATTCCGGA 3'

[A szekvencialistában az 10. azonosítószámon megadott szekvencia]

J5B

5' - ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTC
GCTGCCCAACCAGCCATGGCCGAGCT 3'

[A szekvencialistában az 11. azonosítószámon megadott szekvencia]

J6B

5' - CGCCATGGCTGGTTGGGAGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCTG

CCGTAGGCAATAGGTATTTTCATTATTTATTC 3'

[A szekvencialistában az 12. azonosítószámon megadott szekvencia]

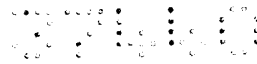
A pKT-STII elkészítése

A pK-STII-plazmidot további módosításoknak vetettük alá, hogy ugyanazokat a szabályozó elemeket tartalmazzák, mint a pKT-pelB, az így kapott új plazmid neve tehát pKT-STII (4,8 kb). A pK2D-t megemésztettük *SpeI*-gyel és *DraIII*-mal, majd a vektort a *g10* szekvenciát, a riboszómakötőhelyet, a mini-cisztront és az STII vezetőszekvenciát kódoló szintetikus oligonukleotidokhoz ligáltuk, 5'-3' irányban. Az oligonukleotidokat 73 bp és 89 bp közötti hosszúságú oligonukleotidok két egymást kiegészítő készleteként szintetizáltuk meg úgy, hogy az oligonukleotid-párok közötti 9 bp hosszú túlnyúló komplementer szakaszok révén lehessen őket összeligálni. A két megtervezett komplementer oligonukleotid pár az A pár (a sorrendben 89 bp és 76 bp hosszú J5A és J6A oligókból áll) és a B pár (a sorrendben 73 bp és 79 bp hosszú J5C- és J6C-oligonukleotidokból áll), szekvenciájuk pedig a következő:

J5A

5' - CTAGTCCGGAATTGGGCATCGATTAAC TTTATTATTA AAAATTAA
AGAGGTATATATTAATGTATCGATTAATAAGGAGGAATAAATA - 3'

[A szekvencialistában az 9. azonosítószámon megadott szekvencia]



J6A

5' - CTCCTTATTTAATCGATACATTAATATATACCTCTTTAATTTTAA
ATAATAAAGTTAATCGATGCCCAATTCCGGA - 3'

[A szekvencialistában az 10. azonosítószámon megadott szek-
vencia]

J5C

5' - ATGAAAAGAATATAGCATTCCTACTAGCTTCAATGTTTCGTCTT
CTCTATTGCAACTAACGCGTACGCACATT -3'

[A szekvencialistában az 13. azonosítószámon megadott szek-
vencia]

J6C

5' - GTGCGTACGCGTTAGTTGCAATAGAGAAGACGAACATTGAAGC
TAGTAGGAATGCTATATTCTTTTTTCATTATTTATTC - 3'

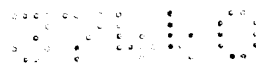
[A szekvencialistában az 14. azonosítószámon megadott szek-
vencia]

4. példa

A pK-pelB-V β 5.3 elkészítése

A T-sejt-antigénreceptor-V β 5.3-fehérje expresszál-
tatását célzó munkában a következő lépés a V β 5.3 szekvencia
a 2. példában fent leírt szignálszekvenciát tartalmazó
plazmidokba történő beépítése volt.

A V β 5.3 teljes nukleotidszekvenciáját a következő-
képpen kaptuk meg: a V β 5.3 klón DNS-szekvenciáját eredeti-
leg Leiden és mtsai. publikálták [Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 83, 4456-4460, (1986)], majd később részben korrigál-
ták [Leiden és mtsai., Molec. Cell Biol., 6, 3207-3214,
(1986)]. Ebből a 12A1-jelű klónból hiányoztak az N-



terminális négy aminosavat kódoló nukleotidok; ráadásul a 12A1-klón származtatott N-terminális aminosavai tévesek voltak. A V β 5.3 (HPB-ALL) N-terminális aminosav-szekvenciáját Jones és mtsai. publikálták [Science, 227, 311-314, (1985)], anélkül azonban, hogy megadták volna az első N-terminális aminosavat, amelyet később glicinként határozott meg Jeff Leiden [nem közölt eredmény]. A fenti szekvenciális információ felhasználásával a teljes V β 5.3 rekonstrukciója megtörtént rekombináns DNS technikákkal. Az eredményként kapott plazmid (pBB-V β 5.3) volt a forrása az alábbi példákban használt V β 5.3 szekvenciának. A V β 5.3-at kódoló teljes hosszúságú nukleotid-szekvenciát, és az ebből jószolt aminosav-szekvenciát nem túl régen publikálták Plaza és mtsai. [J. Immunol., 147, 4360-4365, (1991)] (Lásd még az 1. ábrát, valamint a szekvencialistában a 25., 26, és 27. azonosítószámon megadott szekvenciákat.)

A V β 5.3-at PCR-rel amplifikáltuk a pBB-V β 5.3-at templátként használva. Az 5' "szensz" láncindító egy NcoI restrikciós hasítási helyet tartalmazott (aláhúzással jelezve):

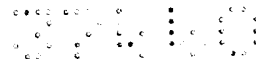
5' - TAATTAGCCATGGCCGGCGTAACCCAATCTCCG - 3'

[A szekvencialistában a 15. azonosítószámon megadott szekvencia]

A 3' "antiszensz" láncindító egy, a vektorban a PstI-helytől 3' -irányba eső régióval volt komplementer:

5' - CCAGTGCCAAGCTTGCATGCC - 3'

[A szekvencialistában a 16. azonosítószámon megadott szekvencia]



A kapott V β 5.3 fragmenst a DNS-polimeráz I. Klenow-fragmensével tompa végűvé tettük, és a pBluescriptIIKS+ defoszforilezett *EcoRV*-helyére ligáltuk, és ezzel a pBL-pelB-V β 5.3-plazmidot kaptuk. A V β 5.3-inszertet *NcoI*- és *PstI*-enzimekkel emésztve hasítottuk ki, agarózgélből tisztítottuk, és a pK-pelB *NcoI*- és *PstI*-helyeire ligáltuk be, eredményként pK-pelB-V β 5.3-plazmidot (5 kb) kaptuk.

A pK-STII-V β 5.3 elkészítése

A V β 5.3-t a pBB-V β 5.3-plazmidot templátként használva PCR-rel amplifikáltuk. Az 5' "szensz" láncindító egy *MluI* restrikciós hasítási helyet tartalmazott (aláhúzással jelölve):

5' - GAAATTAACGCGTACGCAGGCGTAACCCAATCTC - 3'

[A szekvencialistában a 17. azonosítószámon megadott szekvencia]

3' "antiszensz" láncindító egy, a vektorban a *PstI*-helytől 3' -irányba eső régióval volt komplementer:

5' - CCAGTGCCAAGCTTGCATGCC - 3'

[A szekvencialistában a 18. azonosítószámon megadott szekvencia]

A kapott V β 5.3-fragmens végeit a DNS polimeráz-I Klenow-fragmensével tompává tettük, és a pBluescriptIIKS+ defoszforilezett *EcoRV*-helyére ligáltuk, és ezzel a pBL-STII-V β 5.3-plazmidot kaptuk. A V β 5.3-inszertet *MluI*- és *PstI*-enzimekkel emésztve hasítottuk ki, agarózgélből tisztítottuk, és a pK-pelB *MluI*- és *PstI*-helyeire ligáltuk be, eredményként pK-STII-V β 5.3-plazmidot (5 kb) kaptuk.

Eredmények

A pelB- vagy az STII-szignálszekvenciákkal fuzionált Vβ5.3-at *E. coli* JM109 (I. táblázat) törzsben expresszáztattuk. Két órán keresztül indukáltuk, Vβ5.3 termelést EIA segítségével mértük meg.

1. táblázat

A Vβ5.3 expressziója és lokalizációja a sejtben

centrifuga frakció	pK-pelB-Vβ5.3		pK-STII-Vβ5.3	
	0 mM IPTG	1 mM IPTG	0 mM IPTG	1 mM IPTG
felülúszó	0 µg/ml	1,3 µg/ml	0.5 µg/ml	2.2 µg/ml
periplazma	0,9	4,6	N.D.	5.5
citoszol	9,9	méréshatáron túl	2.0	méréshatáron túl

Mindkét szignálszekvencia működött, bár az expresszált fehérjék legnagyobb része a sejtben belül maradt.

5. példa

Ez a példa a szignálszekvenciát és a két szabályzó elemet (a g10 és a mini-cisztron), valamint a Vβ5.3 szekvenciát tartalmazó plazmidokat írja le részletesen.

A pKT-pelB-Vβ5.3-plazmid elkészítése

A pKT-pelB-Vβ5.3-plazmidot úgy készítettük el, hogy a Vβ5.3-inszertet kihalásítottuk a pK-pelB-Vβ5.3-plazmidból az NcoI és PstI enzimek segítségével, és a pKT-pelB-plazmid NcoI- és PstI-helyeire ligáltuk be.

A pKT-STII-Vβ5.3-plazmid elkészítése

A pKT-STII-Vβ5.3-plazmidot az előzőhöz hasonlóan úgy készítettük el, hogy a Vβ5.3-inszertet kihalásítottuk a pK-

STII-V β 5.3-plazmidból az *MluI* és *PstI* enzimek segítségével, és a pKT-pelB-plazmid *MluI*- és *PstI*-helyeire ligáltuk be.

Az összes további plazmidkonstrukcióban az STII szignálszekvenciát használtuk. Ezért, ahol a szignálszekvencia nincs megemlítve, nyilvánvaló, hogy az STII szekvenciáról van szó.

Eredmények

A pKT-V β 5.3

A pK-STII-V β 5.3-plazmidot (4. példa) úgy módosítottuk, hogy két szabályzó elemet tartalmazzon az STII vezetőszekvenciától 5' -irányban, így tehát elkészítettük a pKT-V β 5.3-plazmidot. Ezek az elemek a T7 bakteriofág 10-es génjének (g10) transzlációs enhanszere és egy mini-cisztron, ami 8 aminosavat kódol. Mindkét elemről bebizonyították, hogy számos gén transzlációs hatékonyságát növeli. [Schoner és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5403-5407, (1984); Schoner és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8506-8510, (1986); Olins és mtsai., Gene, 73, 227-235, (1988); Olins és Rangwala, J.Biol. Chem., 264: 16973-16976, (1989)]

A pKT-V β 5.3 akár 8-szor több fehérjetermelésre is képes volt, mint a pK-STII-V β 5.3 (4. példa), *E. coli* JM109 törzsben, IPTG-vel indukálva. Az itt közölt EIA értékek megközelítőek, mivel jelenleg tiszta V β 5.3 standard nem áll rendelkezésre. A pKT-V β 5.3-ról kimutattuk, hogy stabil az *E. coli* JM109-ben.

6. példa

A pKTB-V β 5.3 elkészítése

A pKT-V β 5.3-at (5. példa) tovább módosítottuk úgy, hogy az expresszió után szekretáljon, de ugyanakkor ne legyen szükség IPTG-re az indukcióhoz. A hőérzékeny lac-represszort [Buklinsky és mtsai., Gene, 70 415-417, (1988)] kódoló lacIts-gén jelenléte lehetővé teszi, hogy a génexpressziót a trc-promóterről hőmérséletemeléssel (30 °C-ról 42 °C-ra) kontrolláljuk. Ez kiküszöbölné az IPTG, vagy a lacI-t vagy lacIts-t tartalmazó baktériumsejtek használatát.

A lacIts-gént a pUCts-plazmidból hasítottuk ki, EcoRI-enzimmel való emésztéssel. Az 1,7 kb hosszú fragmens a teljes lacIts kódoló régiót, a társult szabályozóelemeit és a szegélyező vektor-szekvenciát tartalmazta. A fragmens végeit Klenow-fragmenssel tompává tettük és a defoszforilált ScaI-helyre ligáltuk, amely a pKT-V β 5.3-ban az rrnB operontól 3'-irányban helyezkedik el. Ezáltal a pKTB-V β 5.3-plazmidot (6,8 kb) kaptuk. A lacIts-gén orientációját restrikciós térképezéssel határoztuk meg.

Eredmények

A lacIts-gént az rrnB transzkripció terminációs helytől 3'-irányban, mindkét orientációban beépítettük a pKT-V β 5.3-ba, ezzel elkészítettük a pKTB-V β 5.3-plazmidot (2. ábra). Ezt *E. coli* LJ24-ben (lacI-deléció) expresszáltattuk, majd a fehérjét akrilamid gélen [Laemmli, ld. fent (1970)] Coomassie Blue festéssel analizáltuk, va-

lamint Western blot [Towbin és mtsai., ld. fent, (1979)] segítségével.

A *lacIts*-gén az egyik orientációban (amikor a transzkripció irány az ampicillin rezisztenciagén irányába történik) egyértelműen nagyobb $V\beta 5.3$ termelést eredményezett, mint a fordított orientációban.

A feltételezett $V\beta 5.3$ sávot, melyet a lecentrifugált sejtek extraktumaiból kaptunk Immobilon-P membránokra elektrotranszferáltuk, majd Coomassie Blue festéssel vizualizáltuk. A sávot kivágtuk, és N-terminális aminosav-szekvenálásnak vetettük alá [Matsudaira, J. Biol. Chem, 262, 10035-10038, (1987)], ami 10 aminosav meghatározását eredményezte. Ezek precízen illenek a szekvenciára, melyet a processzált $V\beta 5.3$ 10 N-terminális aminosavai alapján határoztak meg, vagyis nem detektáltunk vezetőszekvenciát.

A plazmidot 3 különböző baktériumtörzsben hőindukció segítségével is expresszáltattuk. A baktériumtörzsek mindegyike tartalmaz endogén *lac*-represszort melynek mennyisége LJ24<DH5 α <JM109. Az indukált kultúrákból a felülúszót $V\beta 5.3$ expressziójára nézve EIA segítségével vizsgáltuk meg (2. táblázat).

2. táblázat

A pKTB-V β 5.3 expressziója különböző baktériumtörzsekben

plazmid	szabályzó	<i>E. coli</i> gazda	indukció	indukátlan	indukált
pKTB-V β 5.3	<i>lacIts</i>	JM109 (<i>lacI^q</i>)	42 °C	N.D.	0,5
pKTB-V β 5.3	<i>lacIts</i>	DH5 α (<i>lacI</i>)	42 °C	N.D.	5,0
pKTB-V β 5.3	<i>lacIts</i>	LJ24 (Δ <i>lacI</i>)	42 °C	N.D.	5,2
pKT-V β 5.3	<i>lacI^q</i>	JM109	2 mM IPTG	0	0,9
pKT	<i>lacI^q</i>	JM109	42 °C	N.D.	0

A sejteket 2 órán keresztül indukáltuk, majd a V β 5.3 termelést (μ g/ml) a sejt felülúszókban mértük

Az adatok összhangban vannak a Western blot eredményével, valamint a jósolt eredményekkel, vagyis a legmagasabb expressziós szintet az LJ24 törzsben (Δ *lacI*) a legalacsonyabbat a JM109-ben (*lacI^q*). Az, hogy a sejt kultúra felülúszókban viszonylag kis mennyiségű V β 5.3-at mérhetünk, annak a következménye, hogy az *E. coli* normális esetben nem szekretál fehérjét a táptalajba. Mint az első táblázatban látható, a V β 5.3 nagyobb része a periplazmában marad.

A *lcIts*-gén DNS-szekvenálása

A hőmérsékletemeléssel indukálható *lacIts*-gén teljes kódoló szekvenciáját, a tőle 5'-irányba eső 80 nukleotiddal együtt (amely szakasz a promótert is tartalmazza) megszekvenáltuk, és összehasonlítottuk az IPTG-vel indukálható *lacI*-gén közölt szekvenciájával [Farabaugh, *Nature*, 274 765-769, (1978)]. A promóter régió a *lacI*-gén promóter régiójával volt azonos, és nem a *lacI^q*-ével

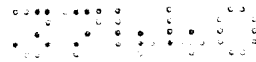
[Calos, M.P., Nature 274 762-765, (1978)]. A *lacI*s-gén szekvenciája 1080 nukleotid hosszúságú nyílt leolvasási keretben 360 aminosavat kódol. A *lacI*-géntől az 559. nukleotidban különbözik (a start kódon első nukleotidjától számítva), amelyik G-ről A-ra változott. Ez aminosavszinten a 187-es glicin (GGC) cseréjét jelenti szerinre (AGC). Ez az egyetlen aminosavváltozás okozza a hőérzékenységet a *lac*-represszor fehérjében.

Ezeken kívül a *lacI*-gén közölt szekvenciája [Farabo, ld. fent (1978)], valamint a "Genebank"-ben (ECOLAC lókus) elhelyezett szekvencia hibás a 857-es pozícióban. A 857-es nukleotid helyesen T és nem C, amely azt jelenti, hogy a 286-os aminosav leucin, (TTA) szerin helyett (TCA). A C-T átmenet egy *HpaI*-helyet alakít ki a *lacI*-gén 3' végén, amit korábban ki is mutattak restrikciós térképezéssel [Brosius, Meth. Enzymol., 216 469-483, (1992)]. Meg kell jegyeznünk, hogy Farabaugh [ld. fent, (1978)] ugyanezt a kódot (TCA) hibásan leucinként közölte szerin helyett.

7. példa

A pKTB elkészítése

A pKTB-V β 5.3 (6,7 kb) plazmidot megemésztettük *SalI*-gyel és *PstI*-gyel, és az 5,42 kb hosszúságú fragmenst agarózgélből a "Geneclean"-reagenskészlet (BIO 101) segítségével megtisztítottuk. A pKT-STII-plazmid (4,8 kb) plazmidot megemésztettük *SalI*-gyel és *PstI*-gyel, az 1,15 kb hosszúságú fragmenst hasonlóképpen tisztítottuk és az



5,42 kb hosszúságú fragmenshez ligáltuk, ezzel a pKTB-plazmidot kaptuk (6,56 kb).

8. példa

A pKB-V β 5.3 elkészítése

Ez a plazmid lényegében azonos a pKTB-V β 5.3-mal, azaz a különbséggel, hogy nem tartalmazza a két szabályzó elemet, vagyis a g10 transzlációt erősítő szekvenciát és a mini-cisztront. A pKTB-plazmidot *SalI*-gyel és *PstI*-gyel emésztettük, és a nagy fragmenst (5,4 kb) agarózgélből tisztítottuk a "GeneClean" reagenskészlet (BIO 101) segítségével. A pK-V β 5.3-plazmidot *SalI*-gyel és *PstI*-gyel emésztettük, és az 1,3 kb hosszúságú fragmenst hasonlóképpen tisztítottuk és ligáltuk az 5,4 kb hosszúságú fragmenshez, és így a pK-V β 5.3-plazmidot (6,7 kb) kaptuk.

Eredmények

pKB-V β 5.3

Mint azt fent tárgyaltuk, két szabályzó elem, azaz a g10 génszegmens és a mini-cisztron hozzáadása láthatóan növelte a V β 5.3 termelést olyan körülmények között, amikor IPTG-vel indukáltunk. Szándékunk az volt, hogy eltávolítjuk ezt a két elemet a pKTB-V β 5.3 vektorból, és így újra megvizsgáljuk a V β 5.3-termelést azokban az esetekben, amikor hőmérséklettel indukálunk. A pKTB-V β 5.3 és a pKTB-V β 5.3 összevetése akrilamid elektroforézissel és Western-blot segítségével azt mutatta, hogy a V β 5.3 termelést nem befolyásolta ezen két elem eltávolítása. Teljes sejtek karbamidos extraktumain végzett EIA mérések kimutatták, hogy a pKB-V β

5.3 több fehérjét termel, mint a pKTB-V β 5.3, amennyiben *E.coli* EJ24 törzsben expresszáltatjuk őket.

3. táblázat

A V β 5.3 expressziója különböző baktériumtörzsekben

Plazmid	LJ24	SJ22094	SG21163	SG21173
pKTB-V β 5.3	90	80	20	30
+ vezető				
+ g10/MC				
pKB-V β 5.3	110	50	40	20
+ vezető				
-g10/MC				
pKTBi-V β 5.3	6	100	100	100
- vezető				
+ g10/MC				
pKBi-V β 5.3	10	170	130	390
-vezető				
-g10/MC				

indukciós idő: 2 óra 42 °C-on

kultúra térfogat: 25 ml

vezetőszekvencia: STII

g10: T7 10-es gén

MC: Mini-cisztron.

Minták: teljes sejt karbamid extraktumok

A V β 5.3 termelés (mg/liter), egység/ml megközelítésen alapul, EIA-val mérve. 1 mg V β 5.3 megközelítőleg megfelel $1 \cdot 10^7$ egységnek.

Igazoltuk, hogy a pKB-V β 5.3-plazmid stabilis, így fermentációra alkalmas.

9. példa

A pKB elkészítése

A pKTB-plazmidot (6,56 kb) *SalI*-gyel és *PstI*-gyel emésztettük, és a nagy fragmenst (5,4 kb) agarózgélből tisztítottuk a "Geneclean" reagenskészlet (BIO 101) segítségével. A pK-STII-plazmidot (4,75 kb) *SalI*-gyel és *PstI*-gyel emésztettük, az 1,1 kb hosszúságú fragmenst hasonlóképpen tisztítottuk, és az 5,4 kb hosszú fragmeshez ligáltuk, ezzel a pKB-plazmidot (6,5 kb) állítottuk elő.

10. példa

A pKTBi elkészítése

Ez a plazmid lényegében azonos a pKTB-vel, de nem tartalmazza az STII szignálszekvenciát. A pKTB-t (6,56 kb) megemésztettük *SpeI*-gyel és *XmaI*-gyel, és egy kettőszálú szintetikus oligonukleotidhoz ligáltuk, ami a *g10*-enhanszert, egy riboszóma-kötőhelyet, és egy második riboszómakötő helyet tartalmazó mini-cisztront kódoló kódolta. A oligonukleotid 3' végén a következő restrikciós helyeket alakítottuk ki: *NcoI*, *DraIII*, *RsrII*, *XmaI*. A két komplementer oligonukleotidnak a következő volt a szekvenciája.

5' - CTAGTCCGGAATTGGGCATCGATTAAC TTTATTATTAAAAATTA
AAGAGGTATATATTAATGTATCGATTAAATAAGGAGGAATAAACC
ATGGCACATTGTGCGGTCCGC - 3'

[A szekvencialistában a 19. azonosítószámon megadott szekvencia]

5' - CCGGGCGGACCGCACAATGTGCCATGGTTTATTCCTCCTTATTTA
ATCGATACATTAATATATACCTCTTTAATTTTTAATAATAAAGTTA
ATCGATGCCCAATCCGGA - 3'

[A szekvencialistában a 20. azonosítószámon megadott szekvencia]

11. példa

A pKBi elkészítése

Ez a plazmid lényegében azonos a pKB-vel de hiányzik belőle az STII szignálszekvencia. A pKTB-t (6,56 kb) *SpeI*-gyel és *DraIII*-mal emésztettük, és egy kettősszálú szintetikus oligonukleotidhoz ligáltuk, amelyik egy riboszómakötőhelyet tartalmazott és melynek a 3' végére egy *NcoI* és egy *DraIII* hasítóhelyet építettünk ki. A két komplementer oligonukleotid szekvenciája a következő volt:

5' - CTAGTAAATTATATTTAAAGGAGGAATAAACCATGGACATT - 3'

[A szekvencialistában a 21. azonosítószámon megadott szekvencia]

5' - GTGCCATGGTTTATTCCTCCTTTAAATATAATTTA - 3'

[A szekvencialistában a 22. azonosítószámon megadott szekvencia]

12. példa

A pKTBi-V β 5.3 elkészítése

Ez a plazmid lényegében azonos a pKTB-V β 5.3-mal, de nem tartalmazza az STII szignálszekvenciát. A pKTBi-t (6,4 kb) *XmaI*-gyel és *NcoI*-gyel emésztettük és egy (a pKTB-V β 5.3-at használva templátként) PCR-rel szintetizált V β 5.3-hoz ligáltuk. Az 5' "szensz" láncindító az *NcoI* restriktációs hasítóhelyet tartalmazta (aláhúzással jelölve):

5' - TATAGTCCATGGGCGTAACC - 3'

[A szekvencialistában a 23. azonosítószámon megadott szekvencia.]

A 3' "antiszensz" láncindító az *XmaI* hasítóhelyet tartalmazta (aláhúzással jelölve):

5' - AACTTCCCGGTTATCATTAGCTGC - 3'

[A szekvencialistában a 24. azonosítószámon megadott szekvencia.]

Eredmények

pKTBi-V β 5.3

A fenti munkával párhuzamosan az STII szignálszekvenciát is eltávolítottuk az expressziós plazmidból. Mivel az expresszált V β 5.3 legnagyobb rész a sejtekben maradt (ld. még lent), azt vártuk, hogy ezen konstrukció léptéknövelése a V β 5.3-molekulál heterogén populációját eredményezi, vagyis szignálszekvenciával rendelkező és nem rendelkező molekulákat. Ez a processzált V β 5.3 tisztítását is megnehezítené, ezért az STII szignálszekvenciát eltávolítottuk, így állítva elő a pKTBi-V β 5.3-plazmidot, intracelluláris expresszió céljára. az expresszált V β 5.3 várhatóan tartalmaz egy N-terminális metionint, bár ezt az aminosavat endogén metionin aminosavak eltávolíthatják. [Ben-Bassat és mtsai., J. Bacteriology, 169, 751-757, (1987); Baneyx és Georgiou, "Expression of Proteolitically Sensitive Polypeptides in *Escherichia coli*"; a "Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A: Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation" című könyvben, szerk.: Tim J. Ahern és Mark C. Manning, Plenum Press, New York, 69-108

old. (1992)], amint azt a pKBi-V β 5.3 (ld. alább) esetében tapasztaltuk.

A pKTBi-V β 5.3-at elkészítettük, de nem expresszált jelentős mennyiségű fehérjét az *E. coli* LJ24 törzsben (ld. fent, 3. táblázat). A teljes V β 5.3 inszertet megszekvenáltuk és vitathatatlanul helyesnek találtuk. Az indukció után izolált és restrikciós emésztéssel analizált plazmid DNS változatlanak tűnt. Az egyik lehetséges magyarázat arra, hogy a pKTBi.V β 5.3-at tartalmazó LJ24-es törzs nem expresszál jelentős mennyiségű V β 5.3 fehérjét az, hogy a szignálszekvencia hiánya destabilizálja a sejten belüli V β 5.3 fehérjét, és ez annak gyors proteolíziséhez vezet. Ezért a pKTBi-V β 5.3-at az SG22094 (lon^- , clp^-), és a BL21 (lon^- , $ompT^-$) törzsekbe transzformáltuk, amelyek SG22904>BL21 sorrendben csökkenő termelést mutattak. Ugyancsak megvizsgáltuk a különböző indukciós hőmérsékletek hatását, és mindkét törzs esetében a 42 °C volt az optimális. Ráadásul, nem volt jelentős termelésnövekedés akkor sem, ha 5 órán keresztül indukáltunk. A pKTBi-V β 5.3-at még proteázhiányos törzsben is kifejeztük: az SG21163-ban (lon^- , $htpr^-$) és az SG21173-ban (lon^- , $htpr^-$, clp^-). Ezeket az eredményeket a 3. táblázatban foglaltuk össze (ld. fent).

Meg kell jegyeznünk, hogy a LJ24, SG22094, SG21163, és az SG21174 törzsek nem termelnek endogén *lac*-represszort, mivel a *lacI*-gént ezen törzsek mindegyikéből kiejtették. A vad típusú *lac*-represszor nem zavarja tehát a *trc*-promóter hőindukcióját. A következő példák megmutatják, hogy a V β 5.3 konstrukciók szignálpeptid távollétében jól

expresszáltathatók proteázhiányos gazdatörzsekben, és jelentős mennyiségű V β 5.3 fehérje termelődését eredményezik.

13. példa

A pKBi-V β 5.3 elkészítése

Ez a plazmid lényegében azonos a pKTBi-V β 5.3-mal, azzal a különbséggel, hogy hiányzik belőle gl0 elem és a 28. azonosítószámon bemutatott mini-cisztron. A pKBi-plazmidot (6,43 kb) NcoI-gyel és SalI-gyel emésztettük, és a 970 bázispár hosszú fragmenst agarózból tisztítottuk. A pKBTi-V β 5.3-at (6,75 kb) NcoI-gyel és SalI-gyel emésztettük, az 5,68 kb hosszú fragmenst hasonlóan tisztítottuk, majd a 970 bázispár hosszúságú fragmenshez ligáltuk, és ezzel a pKBi-V β 5.3-plazmidhoz (6,64 kb) jutottunk.

Eredmények

pKBi-V β 5.3

A szignálszekvencia nélküli V β 5.3 konstrukció, melyből hiányzott a két szabályzó elem, sikeresen expresszálnak volt proteázhiányos törzsekben; megfigyeléseink hasonlóak voltak, mint a pKTBi-V β 5.3 esetében. A pKBi-V β 5.3-at két másik proteázhiányos törzsben is expresszáltattuk, nevezetesen két SG21163-ban (lon⁻, htpr⁻) és az SG21173-ban (lon⁻, htpr⁻, clp⁻). Az eredményeket a 3. táblázatban foglaltuk össze. A pKBi-V β 5.3 következetesen több fehérjét termelt, mint a pKTBi-V β 5.3 minden vizsgált törzsben (3. táblázat). Az expresszált fehérjék N-terminális szekvenálása megmutatta, hogy az első 17 aminosav egyezett a várt V β 5.3-szekvenciával, és a terminális

metionin hiányzott. A plazmidról kimutattuk azt is, hogy stabil.

Oltalmi igényünket természetesen nem korlátozzuk csupán az itt leírt magvalósítási módokra. Szakember számára kézenfekvő lehet, hogy a leírás és a csatolt ábrák alapján a találmány szerinti megoldásban az itt leírtakhoz képest különböző módosításokat hajtson végre. Az ilyen módosítások a mellékelt igénypontok oltalmi körébe tartoznak. Az idézett publikációkat teljes terjedelmükben a kitanítás részeként kell tekinteni.

SZEKVENCIALISTA

AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 34 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TATAATGACT AGTCGCTGCA GCCAACCGCG GCTG

34

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 23 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:



SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GTCCTAGAGT ACTGAGCGGA TAC

23

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 91 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GGCTCGAGCC TAGGCTGCAG CCCGGGGCGC GCGCGGCCGC AGGCCTTTAA 50

TTAAGAGCTC CGGACCGCAC AATGTGGGCG CGCCCTTAAG A 91

A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 97 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZS:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTAGTCTTAA GGGCGCGCCC ACATTGTGCG GTCCGGAGCT CTTAATTAAA 50

GGCCTGCGGC CGCGCGCGCC CCGGGCTGCA GCCTAGGCTC GAGCCGC 97

AZ 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 103 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZS:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTAGTAAATT CTATTTCAAG GAGACAGTCA TAATGAAATA CCTATTGCCT 50

ACGGCAGCCG CTGGATTGTT ATTACTCGCT GCCCAACCAG CCATGGCCGA 100

GCT 103

A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 95 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 105 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 98 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 8 AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GTGCGTACGC GTTAGTTGCA ATAGAGAAGA CGAACATTGA AGCTAGTAGG 50
AATGCTATAT TCTTTTTTCAT TATGACTGTC TCCTTGAAAT AGAATTTA 98

A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 89 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTAGTCCGGA ATTGGGCATC GATTAAC TTT ATTATTAAAA ATTAAAGAGG 50

TATATATTAA TGTATCGATT AAATAAGGAG GAATAAATA 89

A 10. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 76 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 10. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTCCTTATTT AATCGATACA TTAATATATA CCTCTTTAAT TTTTAATAAT 50

AAAGTTAATC GATGCCCAAT TCCGGA 76



A 11. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 71 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 11. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCTGC 50
CCAACCAGCC ATGGCCGAGC T 71

A 12. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 76 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 12. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CGGCCATGGC TGGTTGGGCA GCGAGTAATA ACAATCCAGC GGCTGCCGTA 50
GGCAATAGGT ATTCATTAT TTATTC 76

A 13. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 73 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 13. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATGAAAAGA ATATAGCATT CCTACTAGCT TCAATGTTTCG TCTTCTCTAT 50
TGCAACTAAC GCGTACGCAC ATT 73

A 14. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 79 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 14. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GTGCGTACGC GTTAGTTGCA ATAGAGAAGA CGAACATTGA AGCTAGTAGG 50

AATGCTATAT TCTTTTTCAT TATTTATTC 79

A 15. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 33 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 15. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TAATTAGCCA TGGCCGGCGT AACCCAATCT CCG

A 16. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 21 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 16. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCAGTGCCAA GCTTGCATGC C 21

A 17. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 34 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 17. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GAAATTAACG CGTACGCAGG CGTAACCCAA TCTC 34

A 18. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 21 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 18. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCAGTGCCAA GCTTGCATGC C 21

A 19. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 110 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZS:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 19. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTAGTCCGGA	ATTGGGCATC	GATTAAC TTT	ATTATTA AAA	ATTAAAGAGG	50
TATATATTAA	TGTATCGATT	AAATAAGGAG	GAATAAACCA	TGGCACATTG	100
TGCGGTCCGC					110

A 20. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 110 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZS:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 20. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCGGGCGGAC	CGCACAA TGT	GCCATGG TTT	ATTCCTCCTT	ATTTAATCGA	50
TACATTAATA	TATACCTCTT	TAATTTTTAA	TAATAAAGTT	AATCGATGCC	100
CAATTCCGGA					110

A 21. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 42 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 21. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTAGTAAATT ATATTTAAAG GAGGAATAAA CCATGGCACA TT 42

A 22. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 35 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 22. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GTGCCATGGT TTATTCCTCC TTAAATATA ATTTA 35

A 23. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZ:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 23. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TATAGTCCAT GGGCGTAACC 20

A 24. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 25 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: más nukleinsav

MEGNEVEZÉS: szintetikus oligonukleotid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZS:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 24. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AACTTCCCGG GTTATCATTA GCTGC 25

A 25. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 276 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZS:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 25. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GGC GTA ACC CAA TCT CCG ACT CAC CTG ATC AAA ACG AGA	39
GGA CAG CAC GTG ACT CTG AGA TGC TCT CCT ATC TCT GGG	73
CAC AAG AGT GTG TCC TGG TAC CAA CAG GTC CTG GGT CAG	117
GGG CCC CAG TTT ATC TTT CAG TAT TAT GAG AAA GAA GAG	156
AGA GGA AGA GGA AAC TTC CCT GAT CGA TTC TCA GCT CGC	195
CAG TTC CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG AAT GTG AAC GCC	234
TTG TTG CTG GGG GAC TCG GCC CTG TAT CTC TGT GCC AGC	273
AGC	276

A 26. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 276 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZS:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 26. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCG CAT TGG GTT AGA GGC TGA GTG GAC TAG TTT TGC TCT	39
CCT GTC GTG CAC TGA GAC TCT ACG AGA GGA TAG AGA CCC	78
GTG TTC TCA CAC AGG ACC ATG GTT GTC CAG GAC CCA GTC	117
CCC GGG GTC AAA TAG AAA GTC ATA ATA CTC TTT CTT CTC	156
TCT CCT TCT CCT TTG AAG GGA CTA GCT AAG AGT CGA GCG	195
GTC AAG GGA TTG ATA TCG AGA CTC GAC TTA CAC TTG CGG	234
AAC AAC GAC CCC CTG AGC CGG GAC ATA GAG ACA CGG TCG	273
TCG	276

A 27. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 92 aminosav

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

A 28. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATG TAT CGA TTA AAT AAG GAG GAA TAA 27

A 29. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS:

ANTISZENZS:

SAJÁTSÁG:

NÉV/MEGJELÖLÉS:

ELHELYEZKEDÉS

A 29. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met Tyr Arg Leu Asn Lys Glu Glu

1

5

8

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás idegen proteinszekvenciáktól mentes teljes hosszúságú rekombináns T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje előállítására, azzal jellemezve, hogy

i) kompetens bakteriális gazdasejtet olyan rekombináns expressziós vektorral transzformálunk, amely tartalmaz egy teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjét kódoló régiót és egy indukálható bakteriális promótert;

ii) indukáljuk az i) lépés szerinti transzformált bakteriális gazdasejtben található indukálható promótert; és

iii) az idegen proteinszekvenciáktól mentes teljes hosszúságú rekombináns T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjét kinyerjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy indukálható promóterként kémiaiilag vagy hőmérséklettel szabályozható promótert alkalmazunk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy expressziós vektorként a *lacI*-, *lacI^q*- vagy *lacIts*-regulátorgént is tartalmazó expressziós vektort alkalmazunk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy expressziós vektorként a *lacIts*-gént a T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje kódoló régiójával azonos orientációban tartalmazó expressziós vektort alkalmazunk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy indukálható bakteriális promóterként *lac*-, *tac*-

vagy trc-promótert tartalmazó expressziós vektort alkalmazunk.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy bakteriális gazdasejtként proteázdeficiens gazdadasejteket alkalmazunk.

7. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy expressziós vektorként vezetőszekvenciát is tartalmazó expressziós vektort alkalmazunk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy vezetőszekvenciaként az *Escherichia coli* hőstabil enterotoxinjának (STII) vagy az *Erwinia carotovora* pelB-génjének vezetőszekvenciáját is tartalmazó expressziós vektort alkalmazunk.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy expressziós vektorként az *E. coli* STII-vezetőszekvenciájából származtatható vezetőszekvenciát is tartalmazó expressziós vektort alkalmazunk, és gazdasejtként olyan gazdasejteket alkalmazunk, melyek nem tartalmaznak működőképes *lacI*- vagy *lacI^q*-gént.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy gazdasejtként proteázdeficiens törzset alkalmazunk.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy proteázdeficiens törzsként Sg21163- vagy SG20073-törzset alkalmazunk.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy expressziós vektorként a g10- és minicisztron-szekvenciákat (szekvenciaazonosító szám: 28), mint szabá-

lyező elemeket is magába foglaló expressziós vektort alkalmazunk.

13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy expressziós vektorként az alábbi szekvenciárészleteket is tartalmazó expressziós vektort alkalmazunk:

i) indukálható bakteriális promóterként a *trc*-promótert;

ii) riboszómakötő-helyet;

iii) transzkripció terminátort;

iv) *lacIts* szabályozó génszekvenciát;

v) pBR322-eredetű replikációs origót; és

vi) tetraciklin-rezisztenciagént.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy rekombináns expressziós vektorként a pKTBi-V β 5.3- vagy pKBi-V β 5.3-vektort alkalmazzuk.

15. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy rekombináns expressziós vektorként vezetőszekvenciát is tartalmazó expressziós vektort alkalmazunk.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy rekombináns expressziós vektorként a pK-STII-V β 5.3-, pKT-V β 5.3-, pKTB-V β 5.3- vagy pKB-V β 5.3-vektort alkalmazzuk.

17. Expressziós vektor, amely a *lacIts*-gén szabályozása alatt álló bakteriális promótert tartalmaz, és amely vektorban a *lacIts*-gén szabályozza a teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjét kódoló régió expresszióját, amely teljes hosszúságú T-sejt-antigén-

receptor-V-régió-fehérje idegen proteinszekvenciáktól mentesen expresszálódik.

18. A 17. igénypont szerinti expressziós vektor, amely indukálható bakteriális promóterként lac-, tac- vagy trc-promótert tartalmaz.

19. A 18. igénypont szerinti expressziós vektor, amely vezetőszekvenciát is tartalmaz.

20. A 17. igénypont szerinti expressziós vektor, amely 5' → 3'-irányban tartalmazza az alábbi szekvencia-részleteket:

- i) a trc-promótert;
- ii) egy riboszómakötő-helyet;
- iii) egy teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjét kódoló régiót;
- iv) egy transzkripció terminátort;
- v) a *lacI*_{ts} szabályozó génszekvenciát;
- vi) egy pBR322-eredetű replikációs origót; és
- vii) egy tetraciklin-rezisztenciagént.

21. A 17. igénypont szerinti expressziós vektor, amely a pK-STII-Vβ5.3-, a pKT-Vβ5.3-, a pKTB-Vβ5.3-, a pKTBi-Vβ5.3- vagy pKBi-Vβ5.3-vektor.

22. Bakteriális sejt, amely 17. igénypont szerinti expressziós vektorral van transzformálva.

23. A 22. igénypont szerinti transzformált bakteriális sejt, amely egy liter sejttenyészetre vonatkoztatva képes legalább 300 mg teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-Vβ-fehérjét termelni.

24. Izolált teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje, amely a 13. igénypont szerint lett előállítva.

25. Gyógyászati készítmény, amely teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjét tartalmaz.

26. A 25. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amely T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjeként $V\beta 5.3$ -fehérjét tartalmaz, melynek aminosavsorrendje megegyezik a 27. azonosítószámon bemutatott aminosavszekvencia 1-92. aminosavainak sorrendjével.

27. Eljárás immunrendszerrel összefüggő rendellenesség kezelésére, *azzal jellemezve*, hogy a kezelésre szoruló páciensnek teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjét tartalmazó gyógyászati készítményt adunk be.

28. A 27. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy immunrendszerrel összefüggő rendellenességként szklerózis multiplexet kezelünk.

29. A 28. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjeként $V\beta 5.3$ -fehérjét tartalmazó készítményt adunk be, mely fehérje aminosavsorrendje megegyezik a 27. azonosítószámon bemutatott aminosavszekvencia 1-92. aminosavainak sorrendjével.

30. Izolált teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor- $V\beta 5.3$ -fehérje, melynek aminosavsorrendje megegyezik a 27. azonosítószámon bemutatott aminosavszekvencia 1-92. aminosavainak sorrendjével.

31. Lényegében tiszta T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje alkalmazása, immunrendszerrel összefüggő rendellenesség kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására.

32. A 24. vagy 30. igénypont szerinti izolált teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje, terápiás alkalmazásra.

33. A 24. vagy 30. igénypont szerinti izolált teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérje, immunrendszerrel összefüggő rendellenesség diagnosztizálására.

34. Eljárás immunrendszerrel összefüggő rendellenesség diagnosztizálására, *azzal jellemezve*, hogy valamely páciensből származó biológiai mintában az immunrendszerrel összefüggő rendellenességgel kapcsolatba hozható meghatározott T-sejt-szubpopuláció vagy bizonyos V-régió-fehérjéket felismerő autoantitestek jelenlétének kimutatására rekombináns teljes hosszúságú T-sejt-antigénreceptor-V-régió-fehérjét alkalmazunk.

A meghatalmazott:

DANUBIA
Szabaddalmi és Védjegy Iroda Kft.
46.

Erősen

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

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

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

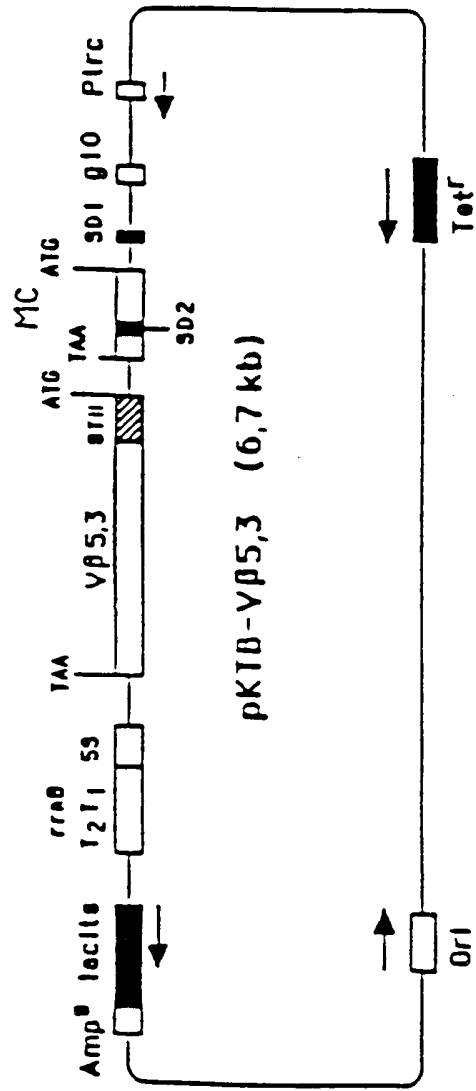
136 CAG TAT TAT GAG AAA GAA GAG AGA GGA AGA GGA AAC TTC CCT GAT
GTC ATA ATA CTC TTT CTT CTC TCT CCT TCT CCT TTG AAG GGA CTA
46 Gln Tyr Tyr Glu Lys Glu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Phe Pro Asp

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

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

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

1. ábra



2. ábra

