

**Egy egyén allergiás reakcióra való hajlamának csökkentésére képes tejsav-  
baktériumok****Kivonat**

5

10

A találmány tárgyát tejsavbaktériumok új törzsei képezik, amelyek képesek csökkenteni egy egyén hajlamát allergiás reakciók kialakítására. Közelebbről, a találmány tárgyát tejsavbaktériumok olyan új törzseinek előállítására képezi, amelyek tolerogén peptideket tartalmazó fehérjéket expresszálnak, és azok alkalmazását egy egyén allergiás reakciók kialakítására való hajlamának csökkentésére. A találmány tárgyát képezik élelmiszer- és gyógyászati készítmények is, amelyek tartalmazzák ezeket a mikroorganizmusokat vagy azok frakcióit.

Ferdin



## Egy egyén allergiás reakcióra való hajlamának csökkentésére képes tejsavbaktériumok

A találmány tárgyát tejsavbaktériumok új törzsei képezik, amelyek képesek csökkenteni egy egyén hajlamát allergiás reakciók kialakítására. Közelebbről, a találmány tárgyát tejsavbaktériumok olyan új törzsei képezik, amelyek tolerogén peptideket tartalmazó polipeptideket expresszálnak, és azok alkalmazását egy egyén allergiás reakciók kialakítására való hajlamának csökkentésére. A találmány tárgyát képezik élelmiszer- és gyógyászati készítmények is, amelyek tartalmazzák ezeket a mikroorganizmusokat vagy azok aktív frakcióit.

Az allergiák az immunrendszer nem megfelelő reakciói különféle anyagokra (allergénekre). Általában az egyének nem hoznak létre jelentős immunreakciót olyan anyagokra, amelyekkel a környezetben rendszeresen találkoznak, mint például pollenre vagy élelmiszerekre, amelyek reakciójának a hiányát magának az immunrendszernek a szuppresszálo mechanizmusának tudják be. Azonban legyengült állapotban egy egyén immunrendszere nem képes betölteni ezt a szuppresszálo aktivitást (amit toleranciának neveznek), és ez specifikus immunreakciót eredményez az allergén ellen — ez az allergiás reakció. Az allergiás reakciók magukban foglalják a biológiailag aktív vegyületek felszabadulását, mint például a hisztamin gyulladásozó közvetítőanyag, leukotriének és enzimek felszabadulását meghatározott sejtekből, mint például masztsejtekből és bazofil sejtekből a környező szövetekbe és érszerkezetekbe. A masztsejtek eloszlanak az egyén szöveteiben, míg a bazofil sejtek az érrendszerben keringenek. Az események IgE ellenanyagokat magában foglaló sorozatában a vegyületek/közvetítőanyagok felszabadulnak a célzott masztsejtekből, farmakológiai reakciót eredményezve.

A múltban az allergiában szenvedő egyének száma növekedett, amit gyakran a folyamatosan növekvő mennyiségű léghőri környezetszennyezésnek tulajdonítanak, amit például a kipufogógázok okoznak. Ezenkívül a fehérjetartalmú anyagok megnövekedett fogyasztásáról is azt tartják, hogy hozzájárul a jelenség kialakulásához, különösen az élelmiszerallergia növekvő előfordulásához. Ezenkívül a mikrobiális fertőzések fejlődő országokban tapasztalható csökkenéséről is azt tételezték fel, hogy az atopikus betegségek növekedésének egyik lehetséges oka.

Az élelmiszerallergiák, sőt még az élelmiszer-intoleranciák bizonyos formái is eléggé gyakoriakká váltak. Az érintett egyének többségéről azt állapították meg, hogy intoleranciát mutatnak az élelmiszerek bizonyos összetevőivel szemben, és a népesség körülbelül 5 százalé-

ka olyan reakciót fejleszt ki az elfogyasztott anyagok ellen, ami elég komoly ahhoz, hogy orvosi ellátást tegyen szükségessé.

Az elmúlt években felhalmozódtak a bizonyítékok arra, hogy az élelmiszer-intolerancia fő oka az, hogy a szervezet olyan anyagokat szív fel, amelyek normálisan kizáródnak, és amelyek felszívódnak az érzékeny egyének gasztrointesztinális (GI) rendszerében. Azt tartják, hogy ez a hibás felszívódás az emésztőrendszerben lévő szövetek hiányosságából származik [Peters és mtsai., *Can. J. of Gastroenterol.* 2, 127. old (1988); Olaison és mtsai., *Scand. J. of Gastroenterol.* 25, 321. old. (1990); Hollander és mtsai., *Ann. of Int. Med.* 105, 883. old. (1986)]. A GI-rendszert bélelő epiteliális sejtek nemrégiben azonosított képessége antigének prezentálására szintén hozzájárulhat a nem megfelelő immunreakciók kiváltásához, ami gyulladáshoz és allergiás állapot kialakulásához vezethet [Campbell és mtsai., *Immunol. Rev.* 172, 315. old. (1999)].

Az élelmiszerallergia megjelenése lényegében bármilyen szövetet érinthet a szervezetben. A nagy felszívási felülete miatt a gasztrointesztinális rendszer a valószínű fő helye a káros anyagok felszívásának. Az élelmiszerallergiák sok tünete magában az emésztőrendszerben jelenik meg, de más szöveteket is érinthetnek, beleértve a bőrt és a légutakat.

A szakterületen különböző megközelítési módokat javasoltak az allergia, közelebbről az élelmiszerallergia kezelésére.

Egy ilyen megközelítési mód célja magának az allergén anyagnak a módosítása oly módon, hogy az allergén potenciálja csökkenjen. Ezt annak az élelmiszer vagy a komponense fogyasztásának a korlátozásával vagy tiltásával érhetjük el, amelyik a problémák okozója. A probléma gyakran abban áll, hogy a specifikus antigénhatású anyag (allergén) az élelmiszerben gyakran nem ismert, és ily módon a legtöbb esetben nem világos, hogy melyik összetevőt kell szelektíven eltávolítani.

Az 5 480 660. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban beszámolnak arról, hogy a búzára allergiás páciensek allergiájának kialakulását csökkenteni lehet olyan fehérjék eliminálásával vagy csökkentésével a lisztben, amelyeknek a molekulatömege nem több mint 30000 Da, és olyanokéval, amelyeknek a molekulatömege 50000 és 70000 Da között van.

A JP 11 04 67 21. számú japán szabadalmi iratban eljárást tárnak fel fehérjetartalmú élelmiszer allergénitálására, amely szerint az élelmiszert összekeverik búzaliszttel, és a keveréket több mint 3 percig sütik 180 °C-on.

A 4 293 571. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban hipoallergén készítmény előállítását írják le, amely szerint fehérjetermészetű anyagot hidrolízisnek vetnek alá,

és megmaradó, nem hidrolizált fehérjéket hőkezeléssel koagulálják, majd ultraszűrik, hogy eltávolítsák a koagulált anyagot és makropeptideket, amelyek allergéneket tartalmazhatnak.

5 Az 5 039 532. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban egy másik eljárást tárnak fel hipoallergén élelmiszer előállítására, amely szerint a terméket enzimatisz hidrolízisnek teszik ki.

Mіндеzen eljárások ellenére az élelmiszer kezelése, vagy akár annak kizárása a napi étrendből végezetül nehéznek bizonyult a gyakorlatban, mivel az étrend megváltoztatását igényli, általában szigorú megszorító intézkedésekkel, ami végső soron befolyásolja az életminőséget és/vagy gátolja az egyén elvárható növekedését.

10 Egy eltérő megközelítési mód az élelmiszerallergia és élelmiszer-intolerancia kezelésére a bélrendszer integritásának helyreállítására és fenntartására irányul, oly módon, hogy az élelmiszerallergének lényegében ne juthassanak át. Ebben a vonatkozásban az 5 192 750. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban N-acetil-glükózamin alkalmazását írják, ami lehetővé teszi, hogy a nyálkahártya gátat képezzen az élelmiszerallergének átjutása ellen,  
15 és fenntartsa a normális funkcióját.

Allergia kezelésének egy még másik megközelítési módja szerint egyének vakcinálását javasolják IgE-molekulák ellen, ami gátolja a masztsejtek és bazofilek beindulását. Ebből a célból a WO 97/31948. számú nemzetközi közzétételi irat vakcinálásra szolgáló specifikus peptideket javasol, amelyek a háromdimenziós szerkezetükben hasonlítanak az IgE-molekula  
20 — amelyek olyan immunglobulinok, amelyek részt vesznek az allergiás és gyulladáshoz vezető reakciók szabályozásában szerepet játszó közvetítőanyagok felszabadításában — konformációjának részleteire. Azt gondolják, hogy az egyének saját immunrendszere végezetül ellenanyagokat hoz létre az IgE-molekulák ellen oly módon, hogy elsöprik ezeket az IgE-molekulákat. Azonban az említett eljárásoknak az a hátránya, hogy a kialakult ellenanyagok keresztreakciót mutathatnak más immunglobulin-osztályokkal, oly módon, hogy az egyén természetes védekező  
25 mechanizmusait károsan befolyásolhatják.

A jelen bejelentő EP 99200130.5 számú, még nem publikált európai szabadalmi bejelentésében egy még további megközelítési módot tárunk fel. Egy olyan hipoallergén készítményt javasolunk, amely nem allergén, nagymértékben hidrolizált fehérjetermészetű anyagot  
30 és/vagy szabad aminosav-bázist és az illető allergén fehérje legalább egy tolerogén peptidjét tartalmazza. Habár ennek a készítménynek sok előnye van a technika állásához viszonyítva, még mindig nehéz előállítani a tolerogén peptidet, amelyet minden alkalommal *de novo* kell előállítani.

Tehát szükség van a szakterületen az allergia kezelésének javított eszközeire.

A találmány célja tehát ilyen eszközök biztosítása.

A fenti célt elértük tejsavbaktériumok új törzseinek biztosításával, amelyek képesek csökkenteni egy egyén hajlamát allergiás reakciók kialakítására. Az új tejsavbaktériumok olyan polipeptidet expresszálnak, amely tolerogén peptidet hordoz, oly módon, hogy a tolerogén peptid specifikus szekvenciáját és lehetőleg konfigurációját is megtartjuk, a stabilitását megőrizzük, és ezáltal az egyén immunrendszere feldolgozhatja és felismerheti azt.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz tartozó ábrákat.

Az 1. ábrán a  $\beta$ -laktoglobulin-hidrolizátum megfelelő frakcióiban lévő peptidek primer szekvenciáját mutatjuk be; a függőleges vonalak diszulfid-hidakat jelölnek.

A 2. ábrán a tolerogén peptidekkel/peptidfrakciókkal kapott eredményeket mutatjuk be különböző kísérletekben.

A tejsavbaktériumokról — különösen a *Lactobacilli* és *Bifidobacteria* — kimutatták, hogy modulálják az immunrendszert anélkül, hogy elhagynák az élőhelyüket, az immunrendszer szabályozásában résztvevő hírvivők (citokinek) termelésével. A tejsavbaktériumok nem pro-inflammatorikus citokinek, mint például IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1 és GM-CSF termelését váltják ki, hanem elősegítik a gyulladást gátló citokinek, mint például TGF- $\beta$  termelését [Blum és mtsai., *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 199. old. (1999)], aminek fontos következményei vannak mind az intesztinális immunológiai homeosztázis, mind az epitéliális gát integritásának fenntartása vonatkozásában [Planchon és mtsai., *J. Cell Physiol.* 181, 55. old. (1999)]. Ennek megfelelően laktobacillus-homogenizátumok orális beadásáról kimutatták, hogy szuppresszív hatást gyakorolnak a mononukleáris sejtek mitogén-indukált proliferációjára [Pessi és mtsai., *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4725. old. (1999)].

A tejsavbaktériumok (LAB) alkalmazhatók fehérjék és peptidek heterológ (túl)termelésére olyan rendszerekkel, amelyek lehetővé teszik idegen gén expresszáltatását kromoszómába történő integrálódás vagy episzómális plazmidelemek révén [lásd például Kuipers és mtsai., *Tibtech* 15, 140. old. (1997)]. Ezenkívül a tejsavbaktériumok képesek nyálkahártyai felszínek kolonizálására, és saját, muramil-peptidekkel kapcsolatos adjuvánshatást mutatnak, ami a peptidoglikán lebomlásának az eredménye.

Ezenkívül kimutatták, hogy bizonyos *Lactobacillus* törzsek elősegítik az antigén-specifikus immunválaszokat, különösen az IgA osztályban [Majamaa és mtsai., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 20, 333. old. (1995)]. A humán IgA-antigén komplexek képtelensége a komplement aktiválására fontos lehet a nyálkahártyai felszínek integritásának fenntartásában.

Ez megakadályozná a lokális gyulladós reakciókat, beleértve a leukociták beáramlását és a immunológiai effektorok felszabadítását, amelyek fokozzák a nyálkahártya-membrán szöveti sérülések miatti permeabilitását. Ezenfelül az immunológiai kizárási mechanizmusok révén az IgA korlátozhatja a mellékes antigének további felszívódását, és ezáltal megszünteti az IgE és IgG izotípusú ellenanyagok által közvetített anafilaktikus reakciókat.

Ezenkívül a laktobacillusokról kimutatták, hogy potenciálják az IFN- $\gamma$  izolált T-sejtek általi termelését [Halpern és mtsai., Int. J. Immunother. 7, 205. old. (1991)]. Nemrégiben az IFN- $\gamma$ -ról kimutatták, hogy gátolja a TNF- $\alpha$  felszabadulását intesztinális nyálkahártyai sejtekből [Bissonnette és mtsai., Int. Arch. Allergy Immunol. 107, 156. old. (1995)]. A megnövekedett IFN- $\gamma$ -szekréció megakadályozhatja a TNF- $\alpha$  káros hatásait [Hernandez-Pando és mtsai., Immunology 82, 591. old. (1994)], és ennek következtében közömbösítheti az élelmiszerallergiával kapcsolatos permeabilitási rendellenességeket. Például a bélrendszer antigénfelvétel elleni gátjának sérülése az atopikus ekcémában kulcsfontosságú meghatározója lehet a közönséges étrendi és környezeti allergének elleni túlzott immunválaszoknak.

A találmányhoz elvezető kiterjedt vizsgálatok folyamán eszközöket terveztünk a tejsavbaktériumok előnyös tulajdonságainak kombinálására potenciális tolerogén peptidokkal, hogy egy hatékony ágenst hozzunk létre egy egyén allergiás reakciókra való hajlamának csökkentésére vagy akár minimalizálására.

A találmány szerint alkalmazható tejsavbaktérium a *Lactobacillus* csoportba vagy a *Bifidobacterium* csoportba vagy *Lactococcus csoportba* tartozik, és előnyösebben az *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. casei*, *L. paracasei* vagy *L. reuteri* csoportokból származik, amelyek mind humán vagy állati eredetűek.

A tolerogén peptid, amely egy egyénben allergiát okozó adott fehérjéből származó peptid, általában körülbelül 200 és 6000 Da közötti méretű, és képes toleranciát indukálni legalább azon fehérje ellen, amelyből származik. Ezenfelül tolerancia indukálható bármilyen olyan anyag ellen is, amelynek azonosak az antigén-determinánsai, mint a specifikus tolerogén peptid által reprezentáltak. A találmány szerint ezt a peptidet rekombináns úton egy tejsavbaktérium által szintetizált polipeptidbe inzertáljuk, amely polipeptid lehet endogén vagy exogén a baktériumban. A tolerogén peptidet oly módon inzertáljuk, hogy a kapott rekombináns polipeptid szélén prezentálódjon, ily módon felismerhető legyen az immunrendszer által.

A polipeptidet a szakterületen jól ismert eljárásokkal expresszáltathatjuk a tejsavbaktériumokban. Például a kereskedelmi forgalomban kapható pNZ124 [Platteuw és mtsai., Appl. Env. Microbiol. 60, 587. old. (1994)], pGK12 [Walke és mtsai., FEMS Microbiol. 138, 233.

old. (1996)] vagy pG+host9 [Maguin és mtsai., J. Bacteriol 178, 931. old. (1996)] vektorokat alkalmazhatjuk az epizómális expresszáltatáshoz. Azonban figyelembe véve a kromoszómába történő integráció kiváló stabilitását, az előnyös lehet az illető polipeptidet kódoló rekombináns gén expresszáltatására. A kromoszómába történő integráció végett homológ rekombinációt alkalmazhatunk, például tejsavbaktériumból származó és a tolerogén peptidet tartalmazó rekombináns gén alkalmazásával, és helyettesíthetjük az endogén gént. Rekombináns géneknek a gazda kromoszómájába történő beépítésére szolgáló eljárások ismerete a szakember köteles tudásához tartoznak.

A polipeptid lehet egy normálisan a sejt belsejében maradó fehérje, de lehet olyan polipeptid is, amelyet a tejsavbaktérium szekretál, vagy amely annak sejtfalába inzertálódik, és a tolerogén peptidet tartalmazó része az extracelluláris részben helyezkedik el. A találmány szerint alkalmazható polipeptidek példái a pepN, pepX, laktát-dehidrogenáz vagy  $\beta$ -galaktozidáz, vagy a bakteriozinok vagy  $\beta$ -réteg fehérjék osztályának a tagjai, vagy sejtfalhoz lehorgonyzott proteáz.

A polipeptid természete nem kulcsfontosságú, azzal a kikötéssel, hogy a tolerogén peptidet oly módon inzertálhatjuk be, hogy elérhető legyen az immunrendszer számára. Azonban ha egyszer egy megfelelő tolerogén peptidet azonosítottunk, a szakember köteles tudásához tartozik a tolerogén peptid ilyen helyzetben való elhelyezése. Ebből a célból a szakember tanulmányozhatja a polipeptidek háromdimenziós modelljeit, amelyekben a tolerogén peptidet be kell inzertálni, és ezen információ alapján megfelelő rekombináns fehérjét tervezhet.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint a rekombináns polipeptidek szekretálódnak, vagy a baktérium sejtfalában helyezkednek el oly módon, hogy a tolerogén peptid állandóan prezentálódik a környezetbe.

A tolerogén peptid allergiás reakciót okozó élelmiszerből származik. Mégsem lényeges, hogy annak aminosav-szekvenciája megfeleljen a natív fehérjében található, hanem bármilyen olyan peptid, amelynek lényegében azonos az aminosav-szekvenciája és lehetőleg a háromdimenziós konformációja, mint az eredeti peptidnek vagy az abból leszármaztatott, és lényegében azonos eredményt adó polipeptidnek, azaz csökkenti az allergiás reakció indukálódását, alkalmas lehet az adott célra.

A tolerogén peptidek forrásaként tejet, szóját, földimogyorót, rákokat, halat, húst, szesámot vagy írótlémet, mint például  $\beta$ -laktoglobulint, szarvasmarha-szérumalbumint vagy kazeint.

Annak érdekében, hogy tolerogén peptideket azonosítsunk, a jelentőséggel bíró allergén anyagot először enzimatis hidrolízisnek vetjük alá körülbelül 10-50%-os mértékig, és a fehérjekeverékben megmaradó enzimatis aktivitást inaktiváljuk, például hőkezeléssel. A fehérjehidrolizátum oldatát feltisztítjuk, és kívánt esetben tovább tisztítjuk. Az így kapott peptideket elválasztjuk, például az oldat kicsapásos kezelésével vagy kromatográfiás oszlopon történő átengedésével.

Azt követően a különböző peptideket tartalmazó frakciókat teszteljük a tolerogén tulajdonságaikra, állati modellben történő teszteléssel. Ebből a célból állatokat, mint például egeret etetünk a megfelelő peptidfrakciókkal, és azt követően immunizáljuk az allergénnel, és mérjük az arra adott választ, mint például a külső megjelenés megváltozásával vagy az IgE szintjének a specifikus mérésével az állatban. Ennek eredményeképpen a tolerogén peptidfrakciók csökkenthetik az állat hajlamosságát az allergénnel szembeni reakcióra, ily módon a megfelelő peptidfrakciót meghatározhatjuk.

Ha egyszer igazoltuk a tolerogén peptidet és annak aminosav-szekvenciáját, a tejsavbaktériumban expresszálandó polipeptid DNS-szekvenciáját beinzertáljuk génszintézeti úton a bakteriális fehérjehordozót kódoló génbe. DNS-szekvenciák manipulálására és fehérjék mikroorganizmusokban történő expresszáltatására szolgáló eljárásokat és módszereket ismertetnek Sambrook és mtsai. [„A Laboratory Manual”, kiad.: Cold Spring Harbor (1992)].

A találmány tárgyát képezik élelmiszer- és gyógyászati készítmények is, amelyek legalább egy ilyen rekombináns tejsavbaktériumot tartalmaznak.

A bakteriális törzset  $10^5$ - $10^{12}$  cfu („colony forming unit”, kolónia alkotó egység”) tartományba eső mennyiségben alkalmazhatjuk a készítményben az anyag g-jaira vonatkoztatva. Hasonlóképpen, a tejsavbaktériumok tenyészetének a felülúszóját vagy annak aktív frakcióját is alkalmazhatjuk a készítményben.

Az élelmiszerkészítmény lehet tej, joghurt, túró, sajt, fermentált tej, tejalapú fermentált termék, jégkrém, gabonaalapú fermentált termék, tejalapú por, csecsemőtápszer vagy — állatok esetében — állateledel.

A gyógyászati készítmény lehet tabletták, folyékony bakteriális szuszpenziók vagy olyan készítmények formájában, amelyek a baktériumok részeit tartalmazzák, mint például csupán a bakteriális sejtek lízisével és a sejtfa-komponensek összegyűjtésével előállított sejtfa-frakció, lehet szárított, szájon át bevehető kiegészítő anyag, csövön adott száraz táplálék vagy csövön adott nedves táplálék.

A gyógyászati készítmény beadásának útja orális, de lehet nazális is.

A találmány tárgyát képezik vakcinák is, amelyek a találmány szerinti baktériumokat vagy azok részeit tartalmazzák. A baktériumok lehetnek élők, vagy kívánt esetben lehetnek legyengítettek, azaz a növekedési potenciáljuk lecsökkentett lehet. A baktériumok részeként elsősorban a jelentőséggel bíró antigént hordozó sejtfalat lehet alkalmazni. A sejtfalat könnyen előállíthatjuk a sejtek lizálásával és a különböző komponensek elválasztásával.

Az alábbi példákban tovább illusztráljuk a találmányt az oltalmi kör korlátozása nélkül.

### 1. példa

10 Tolerogén peptidek izolálása

#### a) Peptidek izolálása.

220 g  $\beta$ -laktoglobulint (Sigma) feloldottunk 5% (w/w) koncentrációban kétszer desztillált vízben. A kapott oldathoz TPCCK-val kezelt tripszint adtunk 1/100 (w/w) enzim/szubsztrát (E/S) arány alkalmazásával, és az oldatot 40 °C-on inkubáltuk pH 7,6-on állandó kevertetés mellett. Egy óra elteltével azonos mennyiségű enzimet adtunk az oldathoz, 2/100 végső E/S arányt eredményezve. Az inkubálást további 4 órán keresztül folytattuk, és az enzimet hőkezeléssel (85 °C, 5 perc) inaktívtuk a reakció leállítása végett. Azt követően a teljes tripszines hidrolizátumot liofilizáltuk, és a kapott peptidterméket kationos gyantán preparatív kromatográfiával elválasztottuk.

20 15 különböző peptidfrakciót nyertünk, körülbelül 2-23 aminosav méretben (körülbelül 240-2720 Da). Az egyes frakciókat nanofiltráltuk, diafiltráltuk, dializáltuk, ismételen liofilizáltuk, és szárazon tároltuk szobahőmérsékleten a felhasználásig. A frakciók peptidtartalmát fordított fázisú nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) is jellemeztük. Összességében 15 frakciót (F1-F15) gyűjtöttünk, amelyek fő komponensként a jelzett peptideket (T) tartalmazták.

Frakció	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15
Tömeg (g)	52	13, 9	11	11, 8	2,5 7	1,9 4	4,3 7	13, 1	5,0 1	6,5 3	1,0 5	3,4 6	1,9	2,6 7	28, 8
Dúsított peptid	—	T6 T17 T18	T23	T23	—	T7 T9	T20 T21 T24	T9 T12 T24	T12 T21	T10 T21	T11	T10	T10 T11	T10 T11	—

A peptideket izoláltuk és megszekvenáltuk. A szekvenciájukat az 1. ábrán mutatjuk be.

Számos peptid bizonyult tolerogénnek különböző kísérleti elrendezésekben, amelyeket részletesen az alábbi irodalmi helyen ismertetnek: Pecquet, R., Bovetto, L., Maynard, F., Frische, R., „Peptides obtained by tryptic hydrolysis of bovine B-lactoglobulin induce specific oral tolerance in mice”, J. Allergy Clin. Immunol. 105, 514-521. old. (2000), amely teljes terjedelmében hivatkozás útján a kitanítás részét képezi.

b) Tolerogén peptidek szintetizálása

A  $\beta$ -laktoglobulin (BLG) három tolerogén peptidjét (T6, T17 és T6/T17, amint fent azonosítottuk) és egy kontroll peptidet (T13) kémiaiilag megsintetizáltunk szegélyező BLG szekvenciákkal, valamint egy extra ciszteinnel, amint alább felsoroljuk:

T6 C F K I D A L N E N K V S R

84 91

T17 C N K V L V L D T D Y K K Y S

92 100

T6/T17 C F K I D A L N E N K V L V L D T D Y K K Y S

84 100

T13 L I V T O T M K S R C

1 8

c) Állatkísérletek

A különböző peptidek tolerogén tulajdonságainak vizsgálatához nőstény Balb/c egereket alkalmaztunk, amelyeket az IFFA-Credo cégtől (L'Abresle, France) szereztünk be. Az állatok mindegyikét tejmentes étrenden szaporítottuk és tartottuk. A kísérletek kezdetekor az állatok 3 hetesek voltak. Szondával natív  $\beta$ -laktoglobulint (5 mg/testtömeg-g), különböző mennyiségű emésztett  $\beta$ -laktoglobulint és különböző mennyiségű, a fenti a) pont alatt előállított peptidet kaptak. A kontroll egereket vizes sóoldattal etettük. Az ilyen étrenden 5 napon keresztül tartott egereket  $\beta$ -laktoglobulinnal és nem rokon antigénként ovalbuminnal (grade V, Sigma) immunizáltunk, hogy megállapítsuk az immunválasz specifitását. Értékeljük a késleltett típusú hiperszenzitivitást (DTH) 21 nappal a szisztémás kezelést követően, összehasonlítva a bal hátsó talp vastagságát az immunizálás előtt és után. Mértük az állatok talpának a vastagságát 24 órával az immunizálás után [ $\Delta$ -vastagságban kifejezve (mm)]. Azt követően vért vettünk az összes egertől, majd kivettük a lépüket, amelyeket összegyűjtöttünk a kezelési cso-

portok szerint. Lépsejtekre specifikus proliferációs vizsgálati eljárást hajtottunk végre az egyes csoportokon. A béltartalmat egyedileg gyűjtöttük össze. A szérum és bélrendszeri mintákat egyedileg lefagyasztottuk -80 °C-on, amíg el nem végeztük az egyes vizsgálati eljárásokat. Az anti-β-laktoglobulin-IgE és anti-ovalbumin-IgE szinteket meghatároztuk mind a szérum, mind

5 bélrendszeri mintákban is.

d) IgE-ellenanyag vizsgálati eljárások

A szérum és intesztinális folyadékot meghígítottuk, és két párhuzamosban mértük az anti-β-laktoglobulin és anti-ovalbumin IgE ellenanyagok szintjét ELISA-val. 20 nem immunizált egér összeöntött mintáját alkalmaztuk negatív kontrollként. A titereket a minta azon hígításából számítottuk, amely a negatív kontroll abszorbanciájának a kétszeresét adta. A titereket

10 a hígítás reciprokának a 10-es alapú logaritmusaként fejeztük ki.

e) sejtenyészetek

A lépsejtek oldatát PBS-ben homogenizáltuk és megtisztítottuk. A sejteket együtt tenyésztettük β-laktoglobulin vagy fitohemagglutinin-A jelenlétében. Tríciált timidint ([<sup>3</sup>H]-Thy, Amersham, Zurich) adtunk a tenyésztés utolsó 6 órájában, és a csészék tartalmát begyűjtöttük és elemeztük szcintillációs számlálással. A stimulációs indexet a teszt és kontroll szintjének a vak levonásával kapott arányaként számítottuk, a [<sup>3</sup>H]-Thy három párhuzamosban való beépülésének átlagos cpm-értékéből.

15

f) szintetikus peptidek orális beadásával indukált tolerancia

Elemeztük a szintetikus peptidek tolerogén képességét parenterális egérmodellben. Az alábbi eredményeket kaptuk:

20

	IgE titer (log) (teszt/kontroll)	Lép limfocita SI (teszt/kontroll)	MLN limfocita SI (teszt/kontroll)
T-6	3,24/3,39	0,53	0,29
T-17	2,67/3,39	0,31	0,41
T-6 / T-17	3,40/3,39	0,92	0,81
T - 13	3,20/3,39	1,70	0,87

SI: Stimulációs index MLN: mezenterikus nyirokcsomó

Láthatjuk, hogy a T-17 jelű szintetikus peptid csökkentette mind az IgE-termelést, mind a T-sejt-proliferációt, míg a T-6 jelű peptid csak a T-sejtes választ csökkentette. Ezzel ellentétben a T-13 jelű kontroll peptid nem indukált orális toleranciát a BLG ellen.

25

## 2. példa

### Rekombináns polipeptid előállítás

Az 1. példában tolerogén tulajdonságuként azonosított T6 és T17 jelű peptideket egy sejt felszínre lehorgonyzott proteázzal fuzionáltattuk, hogy a baktérium felszínén prezentálódjon. Negatív kontrollként a T13 jelű peptidet alkalmaztuk, amely a  $\beta$ -laktoglobulin N-terminális részét tartalmazza.

A sejt felszínén lehorgonyzott proteáz a *Lactobacillus bulgaricus*-ból származott, amelynek a szekvenciáját Gilbert és mtsai. publikálták [J. Bacteriol, 178, 3059-3065. old. (1996)]. Ezt a fehérjét egy 2000 aminosavból álló fehérjének írták le, amely egy 33 aminosavból álló vezetőpeptidet („pre” régió) tartalmaz, amely az enzim sejtéből történő exportjáért felelős, amit egy 154 aminosav hosszúságú szakasz követ („pro” régió), amely a hasítás után az enzim proteolitikus aktivitásának aktiválásáért felelős, és egy 700-800 aminosavból álló szakasz az aktív hellyel. Az azt követő régióról (megközelítőleg 1000 aminosav) azt gondolják, hogy a hasítás specifikitásának meghatározásában és a keletkezett peptidek sejtbe történő transzportjában játszik szerepet, és átéri a sejt falát. A proteáz a sejt falhoz a karboxil-terminálisának utolsó 200 aminosavával van lehorgonyozva, amely felelős a sejt fal peptidoglikán szerkezetéhez történő kovalens kötésért.

Először amplifikáltuk a proteáz génjét a promóterével együtt az alábbi két láncindító alkalmazásával:

5'-TTTTGTGGATCCTTAACTTCATAGCACG-3'

(a gén promóterétől leolvasással ellentétes irányban van, és egy BamHI helyet tartalmaz)

5'-ATATTATCTAGAATTGAATAGATTGCC-3'

(a gén *rho*-tól független terminátorától leolvasással megegyező irányban van, és egy XbaI helyet tartalmaz).

Az amplifikált terméket hasítottuk BamHI és XbaI enzimekkel, és a pNZ124 tejsavbaktérium vektorba klónoztuk, amelyet ugyanezekkel a restriktív enzimekkel emésztettünk, és végül elektroporációval bejuttattuk a plazmidmentes ( $\beta$ -galaktozidáz és proteáz negatív) *Lactococcus lactis*-ba.

A klónozott proteáz aktív helyének régióját helyettesítettük a jelentőséggel bíró peptiddel/polipeptiddel. Ennek elérésére a klónozott proteázt NheI enzimmal — amely 50 bázisnyira leolvasással megegyező irányban található a vezetőpeptid hasítási helyétől — és PvuII enzimmal — amely további 800 bázissal leolvasással megegyező irányban található — hasított-

tuk. A jelentőséggel bíró peptidet (10 aminosav hosszúságig) kódoló DNS-szekvenciát a két restriktációs hely közé inzertáltuk két oligonukleotid alkalmazásával, amelyeket úgy terveztünk, hogy két restriktációs helyet hozzanak létre a végeikkel, ha egyszer hibridizálódtak. Az oligonukleotidok tervezésénél figyelembe vettük, hogy a proteáz génjébe történő ligálás után a rekombináns fehérje olvasási fázisa nyílt maradjon.

Nagyobb polipeptidek beinzertálását a két helyet tartalmazó láncindítókkal történő DNS-amplifikációval hajtottuk végre. Az amplifikált terméket hasítottuk a restriktációs enzimekkel. A DNS-fragmenseket mindkét esetben ligáltuk a proteáz génjéhez, és elektroporációval bejuttattuk *Lactococcus lactis*-ba és *Lactobacillus johnsonii*-ba.

A T6 és T17 jelű peptideket tartalmazó rekombináns plazmidokat 2000. szeptember 22-én letétbe helyeztük a Budapesti Szerződés szerint az „Institute Pasteur”-nél, és azok sorrendben a CNCM I-2563 és CNCM I-2564 letéti számot kapták.

### 3. példa

*Lactococcus lactis* és *Lactobacillus johnsonii* transzformálása

A transzformálás céljából *Lactococcus lactis* törzset (MG1363, plazmidmentes) és La1 *Lactobacillus johnsonii* törzset (Institute Pasteur, elérési szám: CNCM I-1225) növesztettünk éjszakán keresztül MRS tenyésztő tápközegben 37 °C-on *GasPak* anaerób rendszerben. Ennek a tenyészetnek egy alikvotját alkalmaztuk egy másik, 0,5 M szukrózt tartalmazó MRS tenyésztő tápközeg beoltására. Egy további újraoltást követően (2% koncentrációban 200 ml MRS + 0,5 M szukróz tápközegbe) a tenyészetet 0,6-os OD<sub>595</sub> értékig növesztettük. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük 5000 rpm-mel 4 °C-on 10 percen keresztül, és a csapadékot megmostuk egyszer fél térfogatnyi, 1 M szukrózt és 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>-t tartalmazó oldattal, egyszer negyed térfogatnyi, 1 M szukrózt és 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>-t tartalmazó oldattal, és a centrifugálás után kapott csapadékot újra felszuszpendáltuk 3,5 ml 1 M szukróz, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> oldatban és 0,459 ml 87% glicerinben (10% végkoncentráció). A sejteket vagy azonnal felhasználtuk, vagy lefagyasztottuk -80 °C-on.

Az elektroporáció végett a sejtek 40 µl-ét összekevertük 10-100 ng DNS-sel (kevesebb, mint 5 µl térfogatban), és átvittük egy jéghideg 0,2 cm-es elektroporációs küvettába. 200 Ω, 25 µF, 2,5 kV pulzusokat alkalmaztunk jéghideg 0,2 cm-es elektroporációs küvettában. 1 ml MRS + 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub> tápközegét adtunk a küvettába, és a szuszpenziót 2-3 órán keresztül inkubáltuk a megfelelő hőmérsékleten (30 °C-on a *Lactococcus lactis* esetében és 37 °C-on a *Lactobacillus johnsonii* esetében). Amikor ts-plazmidokat (pG+host9) alkalmaz-

zunk, a inkubálást 30 °C-on végezzük. Sorrendben 10 µl és 100 µl alikvotokat szélesztettünk a megfelelő antibiotikumot tartalmazó MRS agarcsészékre, plazmid DNS-sel történő transzformálást követően, és sorrendben 100 µl és 500 µl alikvotokat, amikor ligációs keverékkel transzformáltunk. A csészéket anaerób körülmények között inkubáltuk 24-48 órán keresztül a fent megadott hőmérsékleteken.

Szelekciós közegként eritromicint (2,5 µg/ml) tartalmazó MRS tápközeget, vagy kanamicint (5 µg/ml) tartalmazó MRS tápközeget alkalmaztunk.

#### 4. példa

10 Patkány antiszérumok és monoklonális ellenanyagok előállítása tolerogén BLG peptidek ellen

A T6, T17, T6/T17 és T13 jelű peptideket (amelyeket az I. példában ismertettünk) maleimiddel aktivált KLH kapcsoltuk, és *Titermax* adjuvánszal együtt tejfehérje-mentes étrenden tartott patkányok immunizálására alkalmaztuk. Az első immunizálást követő 115. napig 15 kéthetente levett vérmintákból ELISA-val kimutattuk, hogy a BLG-peptidekre specifikus ellenanyagokat tartalmaznak.

Az anti-T6 és anti-T13 antiszérumok reagáltak a BLG natív (ELISA) vagy denaturált (SDS-PAGE + Western blot) formájával. Az anti-T6 és anti-T17 ellenanyagokról kimutattuk, hogy specifikusan felismerik a rekombináns *L. lactis* felszínén expresszáltatott BLG-peptideket. Az eredményeket az I. táblázatban mutatjuk be.

### I. Táblázat

#### Anti-β-laktoglobulin-peptid antiszérumok reaktivitása

Specifikus antiszérum	T6			T17			T6/17			T13		
	A1	A2	A3	B4	B5	B6	C7	C8	C9	D10	D11	D12
Patkány száma	A1	A2	A3	B4	B5	B6	C7	C8	C9	D10	D11	D12
T6 (ELISA)	+++	+/-	+	-	NT	NT	-	NT	NT	-	NT	NT
T17 (ELISA)	-	NT	NT	+	-	-	+++	NT	NT	-	NT	NT
T6/17 (ELISA)	+++	NT	NT	+	NT	NT	+++	+	-	-	NT	NT
T13 (ELISA)	-	NT	NT	-	NT	NT	-	NT	NT	+	+	+/-
Nat. BLG (ELISA)	+++	+/-	+++	+/-	-	-	-	-	-	+	+	+/-

Den. BLG (SDS-PAGE + WB)	+++	NT	++	-	NT	NT	-	NT	NT	+/-	+++	++
LI/T6 (ELISA)	+/-	-	+++	-	NT	NT	-	-	-	-	NT	NT
LI/T17 (ELISA)	-	NT	NT	+	-	-	-	-	-	-	NT	NT
LI/T13 (ELISA)	-	NT	NT	-	NT	NT	-	NT	NT	-	-	-

ELISA/OD490nm (15/37 °C)

+ > 0,3

++0,2-0,3

+++ 0,1-0,2

5 +/-0,05-0,1

- < 0,1

NT — nem teszteltük

nat. BLG — 3x kristályosított BLG (Sigma), PBS-ben oldva

10 den. BLG — 3x kristályosított BLG (Sigma), SDS mintapufferben feloldva és megforralva

LI/T — rekombináns *Lactococcus lactis*, amely BLG peptidinzertet tartalmazó *Lactobacillus bulgaricus* proteázt hordoz

15 Az anti-BLG-peptid monoklonális ellenanyagokat szekretáló hibridómák előállításához kivettük a lépeket az immunizált patkányokból. A lépsejteket fuzionáltattuk mielóma sejtekkel szokásos módszerek alkalmazásával, és már az első szkrinelés lehetővé tette anti-T6 vagy anti-T17 ellenanyagot termelő populációk azonosítását. Ezeknek a sejteknek a klónozását sejtválogatással hajtottuk végre, hogy biztosítsuk mérőhelyenként egyetlen sejt jelenlétét.

## 20 5. példa

Tolerogén peptidek detektálása ellenanyagokkal

25 Annak érdekében, hogy meghatározzuk, hogy a tejsavbaktériumok olyan módon expresszálják a tolerogén peptideket, hogy azok hozzáférhetőek és felismerhetőek az ellenanyagok által, a rekombináns gént tartalmazó baktériumokat tenyésztettünk 50 ml-es tenyészetekben, és a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük. Azt követően a sejteket kétszer mostuk 50 ml TBS-sel, és végül felfuszpendáltuk azokat 6 ml TBS-ben. A szuszpenzió 75 µl-ét átvittük egy mérőhelyre (feles mérőhelyű lapos fenekű ELISA mikrotiterlemez), és a lemezeket fedő

nélkül hagytuk 37 °C-on, hogy a mérőhelyek kiszáradjanak. A lemezeket 3-szor mostuk TBS/PBS pufferrel addig, amíg a nem kötődött baktériumok kimosódtak, és a mérőhelyeket azt követően blokkoltuk TBS-kazein (1,5 g/l) alkalmazásával, 2 órán keresztül 37 °C-on. A specifikus peptidek ellen termeltetett ellenanyagokat tartalmazó patkány antiszérumot adtunk a mérőhelyekhez. A mérőhelyeket éjszakán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten, 0,2% Tween 20-at tartalmazó TBS-kazeinben való hígítások alkalmazásával. Azt követően a mérőhelyeket háromszor mostuk TBS-sel, és előhívó ellenanyagokat (HRP-vel konjugált kecske anti-patkány-IgG) adtunk a mérőhelyhez, majd 37 °C-on inkubáltuk azokat 0,2% Tween 20-at tartalmazó TBS-kazein oldatban hígítva. A mérőhelyeket háromszor mostuk TBS-sel, és előhívtuk azokat OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel, és leolvastuk 490 nm-en.

Azt figyelhettük meg, hogy mind a *Lactococcus lactis*, mind a *Lactobacillus johnsonii* pozitív reakciót mutatott, jelezve, hogy a tolerogén peptideket felismerték az ellenanyagok.

## 6. példa

15 Nyúl antiszérum előállítás az *L. bulgaricus* prtB proteinázának 472-659. aminosav-oldalláncai ellen

A 472-659. aminosav-oldallancokat (az 1. aminosav az iniciációs metionin) kódoló prtB célszekvenciát (1414-1977. nukleotidok) PCR-rel amplifikáltuk, templátként a pMD114, és az 5'-GCGGATCCGGCTTGGGCGGTGCAGATG-3' szekvenciájú leolvasással ellentétes irányban lévő láncindító (amely egy 5' BamHI helyet tartalmaz), és az 5'-CGCAAGCTTGTGCGAAGTGTTTCATGGC-3' szekvenciájú leolvasással megegyező irányban lévő láncindító (amely egy 5' HindIII helyet tartalmaz) alkalmazásával.

A specifikus PCR-terméket Taq DNS-polimeráz (Perkin-Elmer) alkalmazásával állítottuk elő, az alábbi lépéseket tartalmazó 3 ciklus alkalmazásával: denaturáció 95 °C-on 30 másodpercen keresztül, láncindító-anneálás 56 °C-on 30 másodpercen keresztül, és lánc-hosszabbítás 72 °C-on 45 másodpercen keresztül, majd 27 ciklus következett, amelyekben az anneálási lépés hőmérsékletét 60 °C-ra emeltük.

Sótlanítás és a láncindítók és a dNTP-k eltávolítása után (*High Pure PCR Product Purification Kit*, Roche), a mintát emésztettük BamHI és HindIII enzimekkel, majd azt követően agarózgél-elektroforézissel elválasztottuk, és a jelentőséggel bíró DNS-csíkokat visszanyertük a gélből (*E. Z. N. A. Gel Extraction Kit*, Peqlab).

A megtisztított amplifikált terméket a pQE-9 *E. coli* expressziós vektor (Qiagen) BamHI és HindIII helyei közé ligáltuk, egy hexahisztidin-címkét kódoló szekvenciától leolvással megegyező irányban.

5 Ezzel a vektorral transzformáltuk az *E. coli* M15 [pREP4] törzsét, és előidézttük a heterológ fehérje expresszióját a tenyészet 1 mM IPTG-vel történő indukálásával.

10 Egy 1 literes tenyészet sejtjeit lecentrifugáltuk, lizáltuk denaturáló körülmények között (8 M karbamid). Tiszta lizátumot állítottunk elő centrifugálással, és Ni<sup>2+</sup>-NTA agarózgyöngyökre (Qiagen) vittük fel, amelyet pH 8,0-on ekvilibráltunk, lehetővé téve a hexahisztidin-címkés fehérje kötődését. pH 6,3-on történő mosás után a rekombináns fehérjét pH 4,5-ön eluáltuk.

Az anyagot semlegesítettük 100 mM Tris-Cl (pH 7,5) pufferrel, meghatároztuk a mennyiségét BCA fehérje-meghatározó vizsgálati eljárás (Pierce) alkalmazásával, és a koncentrációját 1 mg/ml-re állítottuk be ugyanazzal a pufferrel.

15 Az antigént komplett Freund-féle adjuvánsban emulgeáltuk, és több intradermális injekcióval beadtuk két nyúlra. Az injekciókat a 0., 14., 28. és 56. napon adtuk be. Az utolsó véreztetést a 80. napon végeztük.

Az antiszérum reaktivitását — amely meglepően erős volt — mind ELISA-val (a felszínen *L. bulgaricus* prtB proteinázt expresszáló rekombináns *Lc.*-vel), mind immunblottolással (a proteináz szekretált formáját expresszáló rekombináns *Lc.* felülűszójával) is igazoltuk.

Szekvencialista

<210> 22

<223> Mesterséges szekvencia leírása: szintetikus

5

<210> 23

<223> Mesterséges szekvencia leírása: szintetikus

<210> 24

10 <223> Mesterséges szekvencia leírása: szintetikus

<210> 25

<223> Mesterséges szekvencia leírása: szintetikus

15 <210> 28

<223> Mesterséges szekvencia leírása: láncindító

<210> 29

<223> Mesterséges szekvencia leírása: láncindító

20

Szabadalmi igénypontok

1. A tejsavbaktériumok csoportjába tartozó bakteriális törzs, amely *Lactobacillus bulgaricus* sejt felszínre horgonyzott proteázához képest heterológ tolerogén peptidet tartalmazó *Lactobacillus bulgaricus* sejt felszínre horgonyzott proteázt expresszál, oly módon, hogy a peptid stabilizált a gyomor és a duodenum enzimeivel általi lebontással szemben, és megtartja a tolerogén tulajdonságait és a *Lactobacillus bulgaricus* sejt felszínre horgonyzott proteáz külső sejtjén prezentálódik.
2. Az 1. igénypont szerinti bakteriális törzs, amely *Lactobacillus* vagy *Bifidobacterium*.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti bakteriális törzs, amelyben a tolerogén peptid élelmiszerből származik.
4. Élelmiszerkészítmény, amely 1-3. igénypontok bármelyike szerinti bakteriális törzset vagy annak felülűszóját tartalmazza.
5. A 4. igénypont szerinti élelmiszerkészítmény, amely tej, joghurt, túró, sajt, fermentált tej, tejalapú fermentált termék, jégkrém, gabonaalapú fermentált termék, tejalapú por, csecsemőtápszer vagy állateledel bármelyike.
6. A 4. vagy 5. igénypont szerinti élelmiszerkészítmény, amelyben a bakteriális törzs  $10^7$  és  $10^{11}$  cfu/dózis közötti mennyiségben van jelen.
7. Gyógyászati készítmény, amely 1-3. igénypontok bármelyike szerinti bakteriális törzset vagy annak felülűszóját tartalmazza.
8. A 7. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amelyben a bakteriális törzs  $10^{10}$  és  $10^{12}$  cfu/dózis közötti mennyiségben van jelen.
9. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti bakteriális törzsnek vagy felülűszójának alkalmazása allergia kezelésére alkalmas ehető hordozó előállítására.
10. A 4-8. igénypontok bármelyike szerinti élelmiszer- vagy gyógyászati készítmény alkalmazása allergia kezelésére alkalmas ehető hordozó előállítására.
11. A 10. igénypont szerinti alkalmazás, orális vagy nazális úton beadható készítmény előállítására.
12. Vakcina, amely 1-3. igénypontok bármelyike szerinti bakteriális törzset vagy annak részeit tartalmazza.

13. A 12. igénypont szerinti vakcina, amelyben lizált baktériumok sejtmembrán-frakciója van felhasználva.

A meghatalmazott:

5

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Lengyel Zsolt

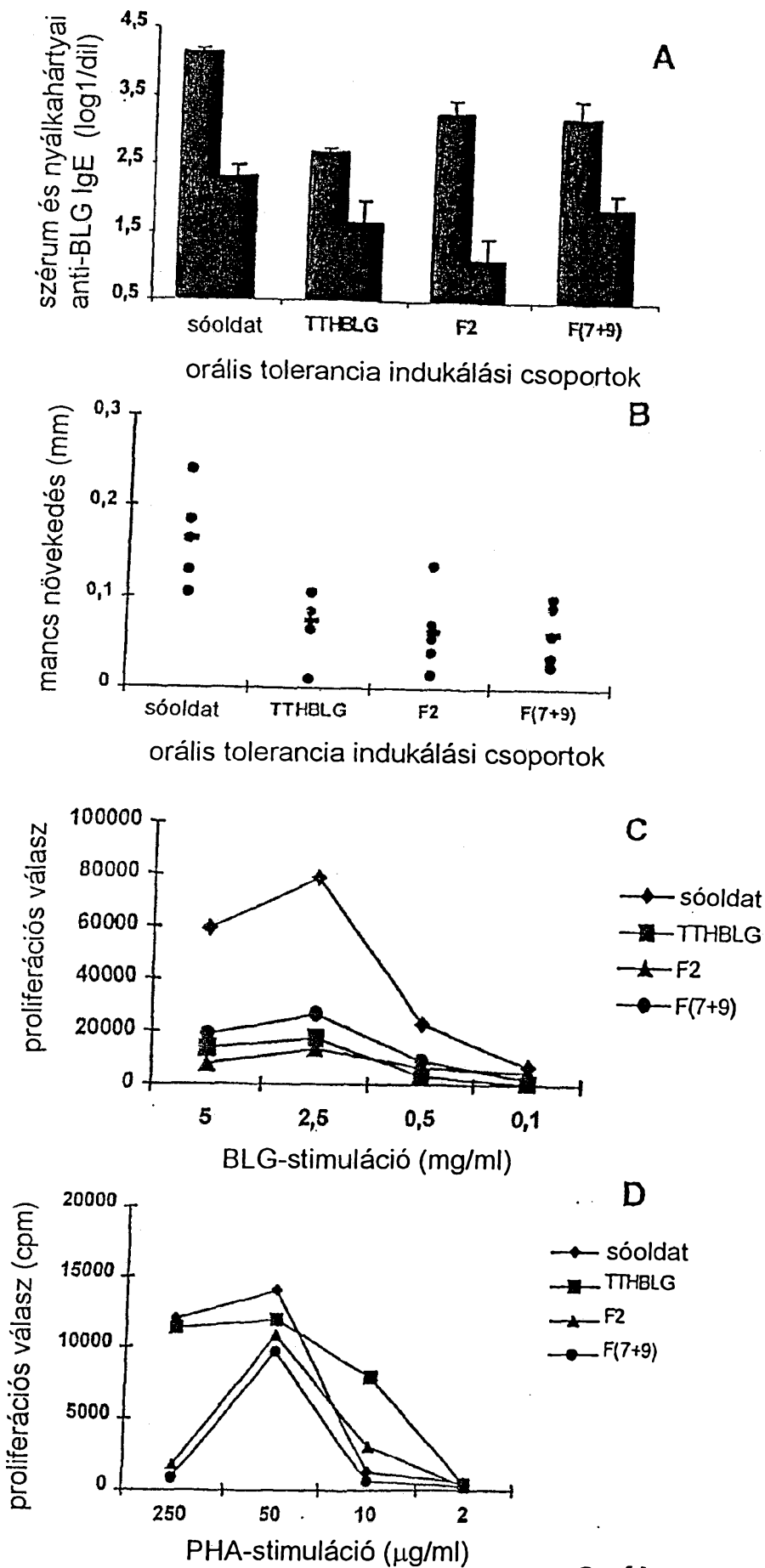
10

szabadalmi ügyvivőjelölt

PCT/EPO/01/10956

Peptid T1 (139-141)	$H_2N-A-L-K-COOH$	Peptid T2 (146-148)	$H_2N-H-I-R-COOH$	Peptid T3 (136-138)	$H_2N-F-D-K-COOH$
Peptid T4 (71-75)	$H_2N-I-I-A-E-K-COOH$	Peptid T5 (62-69)	$H_2N-E-N-G-E-C-A-Q-K-COOH$		
Peptid T6 (84-91)	$H_2N-I-D-A-L-N-E-N-K-COOH$	Peptid T7 (9-14)	$H_2N-G-L-D-I-Q-K-COOH$		
Peptid T8 (142-145)	$H_2N-A-L-P-M-COOH$	Peptid T9, T10, T11 (61-67, -68, -69)	$H_2N-W-E-N-G-E-C-A,-Q,-K,-COOH$		
Peptid T12 (125-135)	$H_2N-T-P-E-V-D-D-E-A-L-E-K-COOH$	Peptid T13 (1-8)	$H_2N-L-I-V-T-Q-T-M-K-COOH$		
Peptid T14 (142-148) = T8 (142-145) + T2 (146-148)	$H_2N-A-L-P-M-H-I-R-COOH$	Peptid T15 (78-82)	$H_2N-I-P-A-V-F-K-COOH$		
Peptid T16 (15-20)	$H_2N-V-A-G-T-W-Y-COOH$	Peptid T17 (92-99, 100)	$H_2N-V-L-V-L-D-T-D-Y-K,-K-COOH$		
Peptid T18 (125-138) = T12 (125-135) + T3 (136-138)	$H_2N-T-P-E-V-D-D-E-A-L-E-K-F-D-K-COOH$				
Peptid T19 (25-40)	$H_2N-A-A-S-D-I-S-L-L-D-A-Q-S-A-P-L-R-COOH$				
Peptid T20, T21 (61, 62-69):S-S:(149-162)			$H_2N-W,-E-N-G-E-C-A-Q-K-COOH$		
			$H_2N-L-S-F-N-P-T-Q-L-E-E-Q-C-H-I-COOH$		
Peptid T22 (21-40)	$H_2N-S-L-A-M-A-A-S-D-I-S-L-L-D-A-Q-S-A-P-L-R-COOH$				
Peptid T23 (41-60)	$H_2N-V-Y-V-E-E-L-K-P-T-P-E-G-D-L-E-I-L-L-Q-K-COOH$				
Peptid T24 (149-162)	$H_2N-L-S-F-N-P-T-Q-L-E-E-Q-C-H-I-COOH$				

1. ábra



2. ábra