P 94 02417

395/95

1190M

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

68170

Kivonat

Módosított tumor citotoxikus faktor (TCF)

Snow Brand Milk Products Co., Ltd. Hokkaido
~~SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.~~ ~~Sapporo~~, JP

A bejelentés napja: 1993. 12. 27.
Elsőbbsége: 1992. 12. 28. (4/359747) JP
A nemzetközi bejelentés száma: PCT/JP93/01905
A nemzetközi közzététel száma: WO 94/14845

A találmány módosított TCF-ekre vonatkozik, amelyekben a vad típusú TCF glükozileződésért felelős aminosav-csoportját (csoportjait) úgy szubsztituálták vagy deletálták, hogy ezzel legalább egy nitrogénen keresztül kapcsolódó oligoszacharid láncot eltávolítsanak. A módosított TCF-nek hosszabb a biológiai felezési ideje, ugyanakkor biológiai aktivitásait megtartja. A módosított TCF-ek terápiás szempontból fontos gyógyszerek májbetegségek esetén vagy rákellenes szerekként használhatók.

P9402417

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A 399/95

1190M

N8IO6 : C12N15/12
C12N 1/21
C07K 15/00

Képviselő: Gödölle, Kékes, Mészáros & Szabó
Szabadalmi és Védjegy Iroda
1024 Budapest, Keleti Károly u. 13/b.

68170

Módosított tumor citotoxikus faktor (TCF)

Snow Brand Milk Products
~~SNOW BRAND MILK PRODUCTS~~ Co., Ltd. ~~Sapporo~~, Hokkaido, JP

Feltalálók: YAMAGUCHI Kyoji, Saitama
SHIMA Nobuyuki, Tochigi
MURAKAMI Akihiko, Tochigi
GOTO Masaaki, Tochigi
TSUDA Eisuke, Tochigi
MASUNAGA Hiroaki, Tichigi
TAKAHIRA Reiko, Tochigi
OOGAKI Fumiko, Tochigi
UEDA Masatsugu, Saitama
HIGASHIO Kanji, Saitama
Japán

A bejelentés napja: 1993. 12. 27.
Elsőbbsége: 1992. 12. 28. (4/359747) JP
A nemzetközi bejelentés száma: PCT/JP93/01905
A nemzetközi közzététel száma: WO 94/14845

A találmány géntechnológiával módosított olyan TCF-ekre vonatkozik, amelyek - összehasonlítva a vad típusú TCF-fel - különböző számú, nitrogénen keresztül kapcsolódó oligoszacharid láncokat tartalmaznak és új aminosav-szekvenciákat tartalmaznak. A találmány szerinti TCF-ek felezési ideje a szérumban hosszabb, a hepatocitákra (májsejtekre) növekedést stimuláló hatást fejtenek ki és a tumor sejtekkel szemben citotoxikus aktivitással rendelkeznek. Ennélfogva a módosított TCF-ek májbetegségek esetén gyógyszerekként, továbbá rákellenes szerekként is használhatók.

A humán fibroblaszt eredetű tumor citotoxikus faktor, a TCF-II, egy olyan új anti-tumor protein, amely minden más eddig közölt proteintől különbözik. Sikerrel járt e protein cDNS klónozása, levezettük teljes aminosav szekvenciáját és bizonyítottuk a hasznosságát. Ezen új anti-tumor proteint és a megfelelő cDNS-t tárgyalja a WO 90/10651 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentés. Ezt TCF-II-vel jelöltük. Ebben a leírásban azt a glükoproteint, amelynek az aminosav szekvenciája a WO 90/10651 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentésben szerepel, TCF-nek nevezzük. A TCF tehát az az anyag, amelyet előzőleg TCF-II-nek neveztünk.

A TCF erős citotoxikus aktivitással rendelkezik tumor sejtekkel szemben és növekedést stimuláló hatást fejt ki normál sejtekre. Megállapítottuk, hogy a TCF egy olyan család tagja, amelyhez a HGF (hepatocyte growth factor), a hepatocita növekedési faktor is tartozik. A TCF molekulatömege 78.000 ± 2.000 dalton és/vagy 74.000 ± 2.000 dalton SDS poliakrilamid-gél elektroforézissel meghatározva. Redukáló körülmények között egy A láncnak nevezett polipeptid sáv jelenik meg, amelynek molekulatömege 52.000 ± 2.000 dalton és két további polipeptid sáv, nevük B lánc és/vagy C lánc, amelyeknek a molekulatömege 30.000 ± 2.000 dalton, illetve 26.000 ± 2.000 dalton.

Minthogy a TCF hepatocita növekedési faktor, hepatektómia után megvizsgáltuk máj regenerálásra történő alkalmazását. Minthogy a TCF biológiai felezési ideje nagyon

rövid, megkíséreltük hatásosabb, meghosszabbított biológiai felezési idejű módosított TCF-ek előállítását.

Bizonyos glükoproteinek esetén - beleértve az eritropoietint is - tanulmányozták az oligoszacharid láncok és a szérum felezési idők közötti összefüggést. A vizsgálatok kimutatták, hogy ugyanabból a génből különböző számú oligoszacharid láncokat tartalmazó és különböző biológiai aktivitású glükoproteinek szintetizálhatók. Ismeretes volt, hogy a glükozilált eritropoietinnek mások a biológiai tulajdonságai, mint a nem glükoziláltnak. Azonban a TCF oligoszacharid láncai és biológiai aktivitásai között fennálló összefüggésről keveset tudtunk.

Megállapítottuk a TCF használhatóságát és tanulmányoztuk a TCF alkalmazását tumorok vagy májbetegségek kezelésére, valamint betegségek esetén diagnosztikumként való felhasználását. A TCF-nek nagyon rövid a felezési ideje, körülbelül 2 perc. Annak érdekében, hogy meghosszabbított felezési idejű, módosított proteinekhez jussunk, számos, genetikailag manipulált TCF-et szerkesztettünk a polipeptid részben végrehajtott mutációk révén, majd ezeket analizáltuk. Kitűnt azonban, hogy a legtöbb módosított protein elvesztette biológiai aktivitását. Ezután, hogy meghosszabbítsuk a biológiai felezési időt anélkül, hogy a biológiai aktivitás elveszne, figyelmünket a TCF-hez nitrogénen keresztül kapcsolódó négy oligoszacharid lánc felé fordítottuk és megkíséreltünk olyan új, módosított TCF-eket szerkeszteni, amelyekből egy vagy több oligoszacharid láncot töröltünk.

A találmány olyan új, módosított TCF-ekre vonatkozik, amelyekben a vad típusú TCF-hez képest különböznek az aminosav szekvenciák, kevesebb a nitrogénen keresztül kapcsolt oligoszacharid láncok száma és amelyeknek hosszabb a biológiai felezési ideje, mint a vad típusú TCF-é. Ezeket a módosított TCF-eket úgy állíthatjuk elő, hogy az N-glükozileződésért felelős aminosavcsoportokat kódoló TCF cDNS nukleotid szekvenciáját megváltoztatjuk és a genetikailag mutagenizált TCF cDNS-t kifejezzük. A találmány

szerinti módosított TCF-ekből a vad típusú TCF-ben lévő, nitrogénen keresztül kapcsolt négy oligoszacharid lánc közül egyet vagy többet törlünk. Ezek az első olyan TCF-ek, amelyeknek úgy hosszabbodott meg a biológiai felezési idejük, hogy biológiai aktivitásukból semmit nem vesztettek és amelyeket a vad típusú TCF aminosavcsoportjainak a megváltoztatása révén állítottunk elő.

Az 1. ábrán a vad típusú TCF teljes aminosav szekvenciája látható, amelyet cDNS szekvenciájából vezettünk le (1.sz. szekvenciavázlat). Az N-glükozileződésért felelős aminosavcsoportokat aláhúztuk. Feltételeztük, hogy a szignál szekvencia eltávolított és hogy a 32. helyzetben lévő glutamincsoport a TCF N-terminális aminosava. Négy oligoszacharid lánc kapcsolódik nitrogénen keresztül az N-terminális aminosavtól számított 258., 366., 530. és 617. helyzetű aszparaginhoz. Ezek az aszparagincsoportok az 1. ábrán látható 289., 397., 561. és 648. helyzetű aszparagincsoportoknak felelnek meg.

A 2. ábra az aminosavszekvenciát kódoló cDNS szekvenciát mutatja be. A kódoló szakasz az ATG kodonnál kezdődik, amelyet az ábrán bekarikáztunk.

N-glükozileződésért felelős aminosavcsoport az Asn-X-Thr vagy az Asn-X-Ser (az aminosavcsoportokat hárombetűs kóddal jelöljük és az X bármilyen aminosavcsoportot jelenthet). Specifikus oligoszacharid lánc(ok) nélküli módosított TCF-et úgy állíthatunk elő, hogy a nukleotid szekvenciát, amelyben az Asn, Ser vagy Thr kodon deletált, vagy ezeket egy másik aminosav helyettesíti, eukarióta sejtekben, előnyösen emlős sejtekben fejezzük ki. Specifikus oligoszacharid láncok nélküli módosított TCF-et úgy kaphatunk, hogy az Asn kodonokat más aminosavakat meghatározó kodonra, például Gln kodonra, cseréljük ki. Ez a szubsztitúció a TCF konformációját kevéssé érinti. A Gln a legelőnyösebb olyan aminosav, amely az Asn-t szubsztituálja. Az Asp, Glu, His, Ser vagy Thr szintén elfogadható. Specifikus oligoszacharid lánc(ok) nélküli módosított TCF-et előállíthatunk úgy is, hogy a Ser kodonokat más aminosavakat

meghatározó kodonra, ilyen például az Ala kodon, cseréljük ki. Ez a szubsztitúció is csekély hatással van a TCF konformációjára. Az Ala a legelőnyösebb aminosav, amely helyettesíti a Ser-t. A Pro, Gly vagy Asn szintén elfogadható. Olyan módosított TCF-et, amelyből hiányzik (hiányoznak) a specifikus oligoszacharid lánc(ok), úgy állíthatunk elő, hogy ha a Thr kodonokat kiejtjük vagy más aminosav kodonokkal helyettesítjük. Az Ala a legelőnyösebb olyan aminosav, amely a Thr-t helyettesíti. A Val, His vagy Asn szintén elfogadható.

A 3. ábrán bemutatjuk a TCF sematikus szerkezetét, amelyben megjelöltük az N-glükozileződés helyeit. Az N-glükozileződés helyeit az N-terminális végtől 1-es, 2-es, 3-as és 4-es számmal számoztuk. Ezek a számok határozzák meg az N-glükozileződési helyek pozícióját.

Annak érdekében, hogy az N-glükozileződésért felelős aminosavszekvenciákat olyanokra változtassuk, amelyek nem glükozileződnek, a cDNS-t PCR-rel (PCR = polymerase chain reaction = polimeráz láncreakció) hely-specifikusan mutagenizáljuk. A reakcióban templátként használjuk a vad típusú TCF cDNS-t és primerekként szintetikus oligonukleotidokat használunk. A primerek szekvenciáit úgy tervezzük meg, hogy deletálják vagy szubsztituálják a DNS szekvenciát, amint azt a fentiekben leírtuk. Más módszerek is alkalmasak mutagenezis céljára.

Módosított TCF-eket termelő sejtvonalakat úgy készíthetünk, hogy az ilyen mutáns cDNS-eket tartalmazó expressziós vektorokkal transzformálunk gazdasejteket. A transzformált sejtvonalak levestenyészetéből izolálhatjuk a módosított TCF-eket.

Például a 289. helyen (1. ábra) lévő Asn - ez az 1-es oligoszacharid lánc kötési helye - szubsztitúciója céljából a cDNS-t in vitro mutagenizáltuk. Ezekhez a mutagenizáló reakciókhoz a WO 90/10651 számon közzétett nemzetközi bejelentésben ismertetett, vad típusú TCF-et kódoló cDNS-t használtuk templátként és a TCF-1R 5'-TCAGTGTCCTGCATAGTAT-3' oligonukleotidot használtuk primer gyanánt. A mutagenizált

cDNS-t tartalmazó expressziós vektorral eukarióta sejtvonalakat - beleértve emlős sejtvonalakat is - transzficiálhatunk. A módosított TCF-eket a transzficiált sejttenyészetek felülúszóiból izolálhatjuk.

A módosított TCF-ek expressziójához az eukarióta sejtek számára megfelelő bármilyen típusu gazda - vektor rendszer alkalmas. A legkedvezőbb a citomegalovirus és a Namalwa sejtek kombinációja, amely a WO 92/1053 számon közzétett nemzetközi bejelentésben szerepel. Az általánosan használt rendszerek közül megemlítjük azt a génsokszorozási rendszert, amely az SV40 promoterből, DHFR génből és a CHO sejtvonalból álló kombinációt használja, vagy olyan expressziós rendszert, amely a bovin papilloma vírus replikációs origó és az egér C127 sejtvonal kombinációját használja.

A módosított TCF-ek tisztítására bármelyik, a biológiailag aktív proteinek tisztítására általánosan használt módszert használhatjuk, például a szerves oldószeres kicsapást, a kisózást, a gél-kizárásos kromatográfiát, a monoklonális antitest használatával végzett affinitáskromatográfiát vagy az elektroforézist. A 3-177236 számú japán szabadalmi bejelentésben szereplő vad típusú TCF-fel szembeni monoklonális antitesteket fel lehet használni a módosított TCF affinitás kromatográfiájához.

A módosított TCF-ek liofilizált vagy fagyasztott állapotban tárolhatók.

Tizenöt módosított TCF-et kaphatunk az oligoszacharid láncok eltávolításának kombinációival. A módosított TCF-eket az eltávolított láncok számával azonosíthatjuk. Például: azt a módosított TCF-et, amelyből az 1-es oligoszacharid lánc hiányzik, TCF-1-nek nevezzük, azt a TCF-et, amelyből mind a négy oligoszacharid lánc hiányzik TCF-1234-nek nevezzük és annak a TCF-nek a neve, amelyből a 2-es és a 3-as oligoszacharid lánc hiányzik, TCF-23. A 4. ábra sematikusan ábrázolja a módosított TCF-hez nitrogénen keresztül kapcsolódó oligoszacharidokat. Mindegyik módosított TCF-nek más a molekulatömege, az eltávolított oligoszacharid

láncoknak megfelelően.

Az alábbiakban az ábrák rövid leírása következik.

Az 1. ábra a vad típusú TCF cDNS szekvenciájából levezetett teljes aminosavszekvenciát mutatja be. A nitrogénen keresztül kapcsolódó oligoszacharid láncok kötéséért felelős aminosavcsoportokat aláhúztuk.

A 2. ábrán a vad típusú TCF cDNS szekvenciája látható. A találmány szerint szubsztituált kodonokat aláhúztuk. A kódoló szekvencia a bekarikázott ATG kodonnál kezdődik.

A 3. ábrán sematikusan ábrázoljuk a vad típusú TCF primér szerkezetét. A körök az N-glükozilező helyeket mutatják és a nyilak az A lánc és a B lánc közötti hasítási helyet.

A 4. ábrán a TCF-hez kapcsolódó oligoszacharid láncok és a módosított TCF sematikus rajza látható.

Az 5. ábra a módosított TCF-eket meghatározó, plazmid tartalmú cDNS-ek szerkesztését mutatja be.

A 6. ábra a TCF-et és a módosított TCF-et kifejező expressziós vektorok szerkesztését mutatja be.

A 7. ábra egy jellegzetes módosított TCF SDS poliakrilamid-gél-elektroforézissel végzett analízisét mutatja be.

A 8. ábra a módosított TCF-nek a hepatociták növekedésére kifejtett stimuláló hatását ábrázolja. Az ábrák az alábbi módosított TCF-ek aktivitását mutatják:

(1) TCF, TCF-1, TCF-2, TCF-3 és TCF-4

(2) TCF-12, TCF-13, TCF-14, TCF-23, TCF-24 és TCF-34

(3) TCF-123, TCF-124, TCF-1234, TCF-134 és TCF-234.

A 9. ábra a módosított TCF tumor citotoxikus aktivitását mutatja be.

A 10. ábra a módosított TCF plazma koncentrációit mutatja azokban a patkányokban, amelyekbe az említett TCF-eket intravénásan injiciáltuk.

Az új, módosított TCF-eket a találmány felhasználásával állítjuk elő. A találmány szerinti TCF-ek előállítását úgy végezzük, hogy kifejezzük az olyan cDNS-eket, amelyekben az N-glükozileződésért felelős aminosavcsoportokat meghatározó

kodonokat vagy más aminosavakat meghatározó kodonokkal szubsztituáljuk vagy deletáljuk. A módosított TCF-ek felezési ideje hosszabb, ami annak köszönhető, hogy a nitrogénen keresztül kapcsolt oligoszacharid láncok kötési helyeinek számát megszabjuk.

A találmányt az alábbi példákkal részletesebben szemléltetjük, anélkül azonban, hogy ezekkel korlátoznánk a találmány oltalmi körét.

1. példa

Módosított TCF-ek előállítása

A módosított TCF-ek előállítása céljából a DNS-eket lényegében a "Molecular Cloning; A Laboratory Manual" (2. kiadás; J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989) című kiadványban leírtak szerint manipuláltuk, mint alább leírjuk.

(1) A TCF DNS klónozása

Az alábbi leírás szerint hely-specifikus mutációkat vezettünk be a TCF cDNS-be egy 6,3 kb méretű expressziós plazmid, a pcDTCF II plazmid révén, amelyet a WO 92/01053 számon közzétett nemzetközi bejelentésben ismertetett módszer szerint állítottunk elő. A pcDTCF II-t tartalmazó E. coli törzset letétbe helyeztük a National Institute of Bioscience and Human Technology intézményben FERM BP-3479 számon.

(2) Hely-specifikus mutációk bevezetésére szolgáló módszerek

1) 1. módszer

i) A TCF cDNS klónozása M13mp18-ban

A pcDTCF II (6,3 kb) úgy állítjuk elő, hogy a humán TCF cDNS teljes kódoló szakaszát bevisszük a BamHI és SphI enzimekkel (Takara Co.) emésztett pcDNS I plazmidba (Invitrogen Co.) (Minden restrikciós enzimet és módosító enzimet a Takara Co. cégtől szereztünk be.) A pcDTCF II-t

BamHI-gyel és SphI-gyel emésztjük 1 órán át 37°C-on, etanollal kicsapjuk, majd 1 %-os agaróz gélben elektroforetizáljuk. A 2,3 kb méretű TCF cDNS fragmentumot a gélből tisztítjuk Gene Clean (Bio 101 Co.) segítségével.

Emellett az M13mp18 (Takara Co.) fág DNS replikatív formáját BamHI-gyel és SphI-gyel emésztjük, etanollal csapjuk ki és vízben feloldjuk. Igy kapjuk a vektor-DNS oldatát. A vektor-DNS oldatot összekeverjük a TCF cDNS-sel, majd DNA Ligation Kit (Takara Co.) segítségével ligáljuk. A ligációs keverék egy részét használjuk az E. coli DH5α sejtek transzformálására. A transzformált sejteket E. coli NM522 indikátor törzs (Invitrogen Co.) sejtjeivel keverjük össze és LB lágy agar lemezekre öntjük ki, hogy plakkokat kapjunk. Az LB táptalaj 1% Bacto Tryptone-t, 0,5% Bacto élesztő kivonatot, 1% nátrium-kloridot és 1% IPTG-t (izopropil-β-D-tiogalaktozid; Takara Co.), továbbá 1% Xgal-t (5-bróm-4-klór-3-indolil-β-D-galaktozid; Takara Co.) tartalmaz. A kétszálú fág DNS-t egy tiszta plakkból izoláltuk, és elkészítettük az egyszálú DNS-t, amelyet templátként használtunk a hely-specifikus mutációk bevezetéséhez.

ii) Hely-specifikus mutációk bevezetése

Egy, az N-glükozilezésre elfogadott Asn-X-Thr aminosavszekvenciában, a 289. aminosavat meghatározó Asn kodont Gln kodonnal cseréltünk ki, ez nem képez N-glükozilezéshez alkalmas aminosavszekvenciát.

Az aminosavak számozásának alapja a vad típusu TCF N-terminális végén lévő Met, mint első aminosav. A TCF-1R oligonukleotidot - 5'-TCAGTGTCCTGCATAGTAT-3' - DNS szintetizátorban (Applied Biosystems Co.) szintetizáltuk. Minden oligonukleotidot szintetizátor használatával szintetizáltunk, hacsak másként nem jelezzük.

A hely-specifikus mutációt oligonukleotidra-irányuló in vitro mutagenezis rendszerrel (Amersham Co.) végeztük, a gyártó cég előirata szerint. Az NM522 E. coli sejteket a reakcióeleggyel transzformáltuk és TCF-1 primerrel, plakk

hibridizációs technikával szűrtük.

Az egyszálú DNS-t egy pozitív plakkból izoláltuk és a szekvenciát a Sanger által leírt didezoxi láncterminációs módszerrel határoztuk meg abból a célból, hogy meggyőződjünk arról, hogy a 289. helyen az Asn aminosavat meghatározó AAT kodon kicserélődött-e a Gln-t meghatározó CAG kodonra. Az 1,4 kb méretű PstI-HindIII DNS fragmentumot, amelyet a pozitív klón kétszálú DNS-éből készítettünk, a PstI-HindIII-mal emésztett pBluescript SK+ (Stratagene Co.) plazmiddal ligáltuk, s így kaptuk a pSKTCFPH-1 plazmidot.

2) 2. módszer

A 399., 563. és 650. aminosavakat meghatározó kodonokba lényegében az R.Higuchi (R.Higuchi, PCR Protocols, 177-183. old., Academic Press, 1990.) által leírtak szerint vittük be a hely-specifikus mutációkat, polimeráz láncreakció (PCR) segítségével. Az N-glükozilezésre általánosan elfogadott Asn-X-Ser aminosav szekvenciában a Ser-t meghatározó kodont Ala kodonnal cseréltük ki minden mutagenizálásnál.

A 399. helyen lévő Ser kodon mutagenizálásához 25 PCR ciklust végeztünk. A reakcióban egy mutáns primert, a TCF-2R-t - 5'-CCAGA-TCTTGTTTGAGCTAAGTTGCCC-3' - és egy vad típusú primert, a TCF701F-et - 5'-GCTGGGATCATCAGACACCAC-3' - használtunk, továbbá az AmliTaq polimerázt (Takara Co.) és templátként a pcDTCF II plazmidból 4 ng-ot. A PCR termékeket Centricon 100 készülékben (Amicon Co.) tisztítottuk a primerek eltávolítása végett. A kapott termékeket BglII és EcoRI restrikciós enzimekkel (Takara Co.) emésztettük és a BglII-EcoRI-gyel emésztett pSKCFPH plazmid 4,1 kb méretű DNS fragmentumához ligáltuk. A pSKTCFPH plazmidhoz úgy jutottunk, hogy a PstI-HindIII-mal emésztett pBluescript SK+ plazmidot és a PstI-HindIII-mal emésztett pcDTCF II-t előzőleg ligáltuk. A ligációs elegy egy részével E. coli DH5α sejteket transzformáltunk. A plazmid DNS-eket ampicillin rezisztens transzformált sejtekből izoláltuk, majd meghatároztuk a DNS szekvenciákat. Kiszűrtük a pSKTCFPH-12 plazmidot, amelyben a TCC Ser kodont a 399.

helyen a GCT Ala kodon helyettesítette. A pSKTCFPH-12 plazmid úgy készült, hogy a PCR termékeket a BglII-EcoRI-gyel emésztett pSKTCFPH-1 plazmid 4,1 kb méretű fragmentumához ligáltuk, hasonló módon. A PCR termékekből származó DNS részletek DNS szekvenciáit minden plazmidban meghatároztuk, szekvenciáik igazolása végett. Az ampicillint a Sigma Co.-tól szereztük be.

Az 563. helyen lévő Ser-t meghatározó kodon mutagenizálását PCR-rel végeztük, 25 ciklusban. A reakcióban egy mutáns primert, a TCF-3R-t - 5'-ATACCAGCTGGGCAACATTGAGAAC-3' - és a TCF1202F vad típusú primert - 5'-GGCAACTTATCCCAAACAAGATCTGG-3 - használtuk, továbbá AmpliTaq polimerázt (Takara Co.) és templátként a pcDTCF II plazmidból 4 ng-ot. A PCR termékeket Centricon 100 készülékben (Amicon Co.) tisztítottuk, hogy eltávolítsuk a primereket. A tisztított termékeket XhoI és PvuII restrikciós enzimekkel (Takara Co.) emésztettük. A pcDTCF II-t XhoI-gyel emésztettük, majd ligáltuk, így jutottunk a pcDTCF ΔXho plazmidhoz, amelyből hiányzik az 1,1 kb méretű XhoI DNS fragmentum. A pcDTCF ΔXho plazmidot SphI-gyel és PvuII-vel emésztettük. A kapott 4,8 kb méretű XhoI-SphI DNS fragmentumot és a 0,5 kb méretű PvuII-SphI fragmentumot tisztítottuk és az XhoI-PvuII-vel emésztett, fent leírt PCR termékekhez ligáltuk DNA Ligation Kit segítségével. A ligációs keverék egy részével MC1061/P3 E.coli sejteket (Invitrogen Co.) transzformáltunk.

A plazmid DNS-eket ampicillin és tetraciklin rezisztens transzformált sejtekből izoláltuk és hasonló módon szelektáltuk a pcDTCF ΔXhoI-3 plazmidot, amelyben az 563. helyen lévő Ser-t meghatározó kodont a GCC Ala kodon helyettesíti. A tetraciklint a Sigma Co.-tól szereztük be.

Két PCR menetben mutagenizáltuk a 650. helyen lévő Ser-t meghatározó kodont. Az első PCR-eket egymástól függetlenül valósítottuk meg, AmpliTaq polimerázzal (Takara Co.) és 4 ng pcDTCF II plazmiddal mint templáttal és a TCF-4F 5'-ACTCTGAATGAGGCTGAAATATGTG-3' mutáns primer és a TCF2203R 5'-GGCATGCACAGTTGTATTGGTGGGTGCTTCAG-3' vad típusú

primer párral vagy a TCF-4R 5'-CACATATTTCAGCCTCATTCAG-AGT-3' mutáns primer és a TCF1685F 5'-AACAGGTTCTCAATGTTTCCCAG-3' vad típusú primer párral. A PCR termékeket DE81 papírral (Whatman Co.) tisztítottuk és ezek egytizedét használtuk a második PCR-hez a TCF2203R és TCF1685F primerek mellett. A PCR termékeket agaróz gélben választottuk el, DE81 papíron tisztítottuk és BglII-vel és SphI-gyel emésztettük. Másrészt a pcDTCF ΔXhoI-egy és a pcDTCF ΔXhI-3-at szintén BglII-vel és SphI-gyel emésztettük, majd a 4,9 kb méretű fragmentumokat tisztítottuk, amelyeket a fent leírt BglII-SphI-gyel emésztett PCR fragmentumhoz ligáltunk DNA Ligation Kit segítségével. A ligációs elegy egytizedét használtuk az MC1061/P3 E.coli sejtek transzformálására. A plazmid DNS-eket az ampicillin- és tetraciklin-rezisztens transzformált sejtekből izoláltuk, majd hasonló módon szelektáltuk a pcDTCF ΔXhoI-4 plazmidot, amelyben a 650. helyen lévő Ser-t meghatározó TCT kodon az Ala GCT kodonjára cserélődött és a pcDTCF ΔXhoI-34 plazmidot, amelyben az 563. helyen és a 650. helyen lévő Ser kodonokat az Ala kodonok helyettesítették.

(3) Expressziós vektorok szerkesztése

1) Vektorok szerkesztése tranziens expresszióhoz

A pSKTCFPH, pSKTCFPH-1, pSKTCFPH-2 és pSKTCFPH-12 plazmidokat XhoI-gyel emésztettük és az 1,1 kb méretű DNS fragmentumokat tisztítottuk. A pcDTCF ΔXhoI, pcDTCF ΔXhoI-3, pcDTCF ΔXhoI-34 plazmidokat XhoI-gyel emésztettük és négyféle fent leírt 1,1 kb méretű DNS fragmentumhoz ligáltuk. Tizenöt ligációs elegyet - kivéve a pSKTCFPH 1,1 kb és pcDTCF ΔXhoI kombinációt - használtunk MC1061/P3 E. coli sejtek transzformálásához. Tizenöt expressziós vektort szelektáltunk: pcDTCF-1, pcDTCF-2, pcDTCF-3, pcDTCF-4, pcDTCF-12, pcDTCF-13, pcDTCF-14, pcDTCF-23, pcDTCF-24, pcDTCF-34, pcDTCF-123, pcDTCF-124, pcDTCF-134, pcDTCF-234 és pcDTCF-1234. Restrikciós enzimes analízissel igazoltuk e vektorok szerkezetét. Ha ezekkel a plazmidokkal emlős sejteket transzficiálunk, például COS sejteket, a TCF-et és a módosított TCF-et meghatározó gének a citomegalovirus

(CMV) promoter szabályozása alatt kifejeződnek. Ezeknek a plazmidoknak a szerkezetét az 5. ábrán mutatjuk be.

2) Vektorok szerkesztése stabil expresszióhoz

A pHSG396 plazmidot (Takara Co.) HindIII-mal emésztettük, tompa végeket alakítottunk ki a DNA Blunting Kit (Takara Co.) segítségével, Gene Clean-nel tisztítottuk és a 8mer 5'-GCGGCCGC-3' NotI linkerhez (Takara Co.) ligáltuk. Ezzel transzformáltunk DH5α E. coli sejteket. A plazmid DNS-eket kloramfenikol rezisztens transzformált sejtekből izoláltuk, majd szelektáltuk a pHSG NotI plazmidot, amely HindIII helyet nem, de NotI helyet tartalmazott. A pHSG-NotI plazmidot SalI-gyel és SphI-gyel emésztettük és a SalI-gyel és SphI-gyel emésztett 2,3 kb méretű teljes hosszúságú TCF cDNS-hez ligáltuk. Igy kaptuk a pHSG N-TCF plazmidot. A pHSG N-TCF plazmidból deletáltuk az 1,1 kb méretű XhoI-XhoI fragmentumot, így kaptuk a pHSG N-TCFII ΔX plazmidot. A pHXG N-TCFII ΔX plazmidot BstPI-gyel és SphI-gyel emésztettük és a 2,3 kb méretű DNS fragmentumot tisztítottuk, majd DNA Ligation Kit segítségével a BstPI-gyel és SphI-gyel emésztett alábbi 15 plazmidhoz ligáltuk pcDTCF-1, pcDTCF-2, pcDTCF-3, pcDTCF-4, pcDTCF-12, pcDTCF-13, pcDTCF-14, pcDTCF-23, pcDTCF-24, pcDTCF-34, pcDTCF-123, pcDTCF-124, pcDTCF-134, pcDTCF-234 és pcDTCF-1234, valamint a vad típusú TCF cDNS-t tartalmazó BstPI-SphI-gyel emésztett pcDTCF-hez ligáltuk. Ezekkel a plazmidokkal E. coli DH5α sejteket transzformáltunk. A plazmid DNS-eket kloramfenikol rezisztens transzformált sejtekből preparáltuk és 16 olyan plazmidot szelektáltunk, amelyek a 2,3 kb méretű vad típusú TCF cDNS-t vagy a pHSG NotI plazmidban lévő egyes mutáns TCF cDNS-eket tartalmazták.

Ezeket a plazmidokat a következőképpen neveztük el: pHSGN-TCF, pHSGN-TCF-1, pHSGN-TCF-2, pHSGN-TCF-3, pHSGN-TCF-4, pHSGN-TCF-12, pHSGN-TCF-13, pHSGN-TCF-14, pHSGN-TCF-23, pHSGN-TCF-24, pHSGN-TCF-34, pHSGN-TCF-123, pHSGN-TCF-124, pHSGN-TCF-134, pHSGN-TCF-234 és pHSGN-TCF-1234. Ezt a 16 plazmidot SalI-gyel és NotI-gyel emésztettük,

az XhoI-NotI-gyel emésztett BCMGSneo expressziós vektorba ligáltuk és DH5α E.coli sejtek transzformálására használtuk. A BCMGSneo egy olyan plazmid, amely tartalmazza a bovin papilloma vírus (BPV) replikációs origót és a citomegalovirus promotert, továbbá képes E. coliban replikálódni. A BCMGSneo plazmidot dr. H. Karasuyama (Basel Immunological Institute) bocsátotta rendelkezésünkre, leírását az Idenshikohgaku című kézikönyv (297-299, old., Yohdo Co., 1991.) tartalmazza. A plazmid DNS-eket ampicillin rezisztens transzformált sejtekből izoláltuk és 16 olyan expressziós vektort szelektáltunk, amelyek a BCMGSneo-ban a 2,3 kb méretű vad típusú TCF cDNS-t vagy az egyes mutáns TCF cDNS-eket tartalmazták. Ezeket a plazmidokat a következőképpen jelöltük: pBPV-TCF, pBPC-TCF-1, pBPC-TCF-2, pBPC-TCF-3, pBPV-TCF-4, pBPV-TCF-12, pBPV-TCF-13, pBPV-TCF-14, pBPV-TCF-23, pBPV-TCF-24, pBPV-TCF-34, pBPV-TCF-123, pBPV-TCF-124, pBPV-TCF-134, pBPV-TCF-234, pBPV-TCF-1234. Az antibiotikumokat, így a kloramfenikolt a Sigma Co.-tól szereztük be. A pBPV-TCF-3 vagy pBPV-TCF-13 plazmidot tartalmazó E. coli törzseket a National Institute of Bioscience and Human Technology intézménynél helyeztük letétbe FERM BP-4454 és FERM BP-4455 számon.

(3) A TCF- és módosított TCF-expressziós plazmidok izolálása és tisztítása

A 16 E. coli törzset, amelyek a pBPV-TCF-1, pBPV-TCF-2, pBPV-TCF-3, pBPV-TCF-4, pBPV-TCF-12, pBPV-TCF-13, pBPV-TCF-14, pBPV-TCF-23, pBPV-TCF-24, pBPV-TCF-34, pBPV-TCF-123, pBPV-TCF-124, pBPV-TCF-134, pBPV-TCF-234 és pBPV-TCF-1234 expressziós vektorokat tartalmazták, 50 μg/ml ampicillint tartalmazó 400 ml táptalajban tenyésztettük 37°C-on. Ha a tenyészlevek 600 nm-en mért abszorpciója elérte a 0,8 értéket, a levestenyészetekhez annyi kloramfenikolt adtunk, hogy 170 μg/ml legyen a végső koncentrációja, majd egy éjszakán át tovább tenyésztettünk. Ezt a 16 plazmidot alkáli-SDS módszerrel preparáltuk és cézium-klorid sűrűség grádiens ultracentifugálással tisztítottuk Maniatis és

munkatársai leírása szerint (Molecular Cloning, 2. kiadás).

(4) TCF- és módosított TCF-expressziós plazmidok transzfekciója állati sejtvonal tenyészetekbe

A C127 egér sejtvonalat a 16 expressziós plazmiddal TRANSFECTAM készítménnyel (IBF Co., Maryland, USA) - amely tenyésztett emlős sejtvonalakhoz alkalmas DNS transzfekciós reagens - transzfektáltunk, az alább leírtak szerint. A transzfekciót megelőző napon körülbelül 10^6 C127 egér sejtet szuszpendálunk 10% fetális borju szérumot tartalmazó DME táptalajban (Gibco Co.). A sejteket 37°C-on inkubáljuk szén-dioxid inkubátorban (5-7% szén-dioxidot tartalmazó nedves atmoszféráju inkubátor), 25 cm^2-es tenyésztő palackokban (Sumitomo Bakelite: adherens sejtek számára). (A sejteket 37°C-on, 5-7% szén-dioxid tartalmú nedves atmoszférájú inkubátorban tenyésztjük, hacsak másként nem jelezzük). Transzfekció előtt a sejteket kétszer mossuk Opti. MEM táptalajjal (Gibco Co.). Miután az egysejtréteghez 2 ml Opti.MEM tápoldatot adtunk, a transzfekciót 10 µg plazmid DNS-sel végezzük a gyártó cég előirata szerint. Hat órás inkubálás után 7,5 ml DME táptalajt adunk minden palackhoz. Ezután a sejteket további 2 napig inkubáljuk 37°C-on. Az első nap a táptalajt friss DME táptalajjal cseréljük le. A sejteket tripszinnel kezeljük, egyszer mossuk DME táptalajjal és 50 ml 100 µg/ml G418-at tartalmazó DMS táptalajban szuszpendáljuk. A szuszpenzióból 100 µl-t mérünk 96 tartályos (lapos fenekű) lemezek minden tartályába, a lemezeket 37°C-on inkubáljuk. Egy héttel később 100 µg/ml G418-at tartalmazó DME táptalajból 100 µl-t adunk minden tartályhoz, majd a lemezeket 37°C-on inkubáljuk. Egy hét mulva a TCF vagy a módosított TCF-ek expresszióját úgy mutatjuk ki, hogy a tenyészlé 100 µl-ében mérjük a TCF vagy a módosított TCF-ek koncentrációját enzim-immunassay segítségével, anti-TCF monoklonális antitestek [N. Shima et al., Gastroenterologia Japonica, 26, 477/482 (1990)] alkalmazásával. A TCF-et vagy módosított TCF-eket kifejező sejtvonalakat 37°C-on tenyésztjük vagy

12-tartályos szövettenyésztő lemezen vagy 25 cm^2-es palackban, a sejtszámnak megfelelően. Olyan sejtvonalakat kaptunk, amelyek módosított TCF-eket fejeztek ki (az összesen 15 módosított TCF-et a következőképpen jelöltük: TCF-1, TCF-2, TCF-3, TCF-4, TCF-12, TCF-13, TCF-14, TCF-23, TCF-24, TCF-34, TCF-123, TCF-124, TCF-134, TCF-234 és TCF-1234).

(5) A TCF-et vagy a módosított TCF-eket termelő sejtvonalak nagybani tenyésztése

A 75 cm^2-es szövettenyésztő palackokban a TCF-et vagy a módosított TCF-eket termelő sejtvonalak összefolyt sejtjeit tripszines kezeléssel arattuk le, majd a sejtekkel három 225 cm^2-es szövettenyésztő palackot oltottunk be. Minden palackhoz 100 ml DME táptalajt adtunk és a tenyészeteket 37°C-on inkubáltuk. Négy nap mulva az összefolyt sejteket tripszineztük és DME táptalajban szuszpendáltuk. A sejt szuszpenziót tízszeresére higítottuk DME táptalajjal (az összmennyiség 3 liter). A higított sejtszuszpenzióból 100 ml-rel újabb 225 cm^2-es szövettenyésztő palackot oltottunk be. Harminc 225 cm^2-es szövettenyésztő palackban 5 napig 37°C-on tenyésztettük a sejteket. A tenyészetek felülúszóját (összesen 3 liter) összegyüjtöttük. A sejteket 6 palackból arattuk le, s a sejtekkel ezután hatvan 225 cm^2-es szövettenyésztő palackot oltottunk be. Minden palackhoz 100 ml táptalajt adtunk, és a palackokat 5 napig 37°C-on inkubáltuk. A tenyészetek felülúszóját (összesen 6 liter) összegyüjtöttük. Ilyen módon 9 liter olyan felülúszót kaptunk, amely a TCF-et és a módosított TCF-eket tartalmazta.

(6) A TCF és a módosított TCF-ek tisztítása

Egy háromlépéses tisztítási módszert alkalmaztunk, az alábbiak szerint.

1) Heparin-Sepharose CL-6B.

A 9 liter tenyészet-felülúszót, amely az összes módosított TCF-et tartalmazta, 6000 ford/perc mellett 30

percig centrifugáltuk az oldhatatlan anyagok eltávolítása céljából. A felülúszót körülbelül 200 ml/óra átfolyási sebességgel egy olyan heparin Sepharose CL-6B oszlopra (2,5 x 12 cm) (Pharmacia Co.) vittük fel, amelyet előzőleg 300 ml kiegyensúlyozó pufferrel (0,5 M nátriumklorid, 0,01% Tween 20 tartalmú 10 mM trisz.HCl puffer: pH = 7,5) hoztunk egyensúlyba. Az oszlopot ezután körülbelül 700 ml kiegyensúlyozó pufferrel mostuk. A TCF-et vagy a módosított TCF-eket 2 M nátrium-klorid és 0,01% Tween 20 tartalmú trisz.HCl pufferrel (pH = 7,5) eluáltuk és 3 ml-es frakciókat szedtünk. A frakciókat a 280 nm-en mért abszorpció révén figyeltük. A TCF vagy a módosított TCF tartalmú frakciókat (körülbelül 100 ml) összegyüjtöttük.

2) Mono-S-FPCL

A TCF-et vagy a módosított TCF-eket tartalmazó eluátumot 0,15 M nátrium-kloridot tartalmazó 10 nM foszfát pufferrel (pH = 6,5) szemben dializáltuk, majd 12.000 ford/perc mellett 90 percig centrifugáltuk az oldhatatlan részek eltávolítása céljából. A felülúszót 1 ml/perc átfolyási sebességgel olyan Mono-S oszlopra (0,5 x 5 cm: Pharmacia Co.: FPLC) vittük fel, amelyet előzőleg körülbelül 20 ml 0,15 M nátrium-kloridot és 0,01% Tween 20-at tartalmazó 10 mM foszfát pufferrel (pH = 7,0) (A puffer) hoztunk egyensúlyba. Az oszlopot egyszer mostuk körülbelül 30 ml A pufferrel. Ezután a TCF-et vagy a módosított TCF-eket 0,5 ml/perc átfolyási sebesség mellett eluáltuk az oszlopról, nátrium-klorid lineáris grádiensében (1,0 M-ig) és 0,5 ml-es frakciókat szedtünk. A TCF vagy módosított TCF-eket tartalmazó frakciók (körülbelül 4 ml) 0,7 - 0,8 M nátrium-klorid mellett oldódtak le.

3) Heparin 5-PW-FPLC

Két térfogat (8 ml) 0,01% Tween 20-at tartalmazó 10 mM trisz.HCl puffert (pH = 7,5) adtunk a TCF-et vagy módosított TCF-eket tartalmazó eluátumhoz. A higított oldatot 1 ml/perc átfolyási sebességgel olyan heparin 5-PW oszlopra (0,5 x 7,5

cm: TOSO Co., FPLC) vittük fel, melyet előzőleg körülbelül 20 ml 0,3 M nátrium-kloridot és 0,01% Tween 20-at tartalmazó 10 mM trisz.HCl pufferrel (pH = 7,5) (B puffer) hoztunk egyensúlyba. Az oszlopot körülbelül 30 ml B pufferrel mostuk. Ezután a TCF-et vagy a módosított TCF-eket 0,5 ml/perc átfolyási sebesség mellett, nátrium-klorid lineáris grádiensében (2,0 M-ig) eluáltuk és 0,5 ml-es frakciókat szedtünk. A TCF-et vagy a módosított TCF-eket tartalmazó frakciókat (amelyek körülbelül 1,3 M nátrium-klorid-nál oldódtak ki, összmennyiségük 3 ml) összegyüjtöttük. Ezeket a frakciókat ionmentesített vízzel szemben dializáltuk, liofilizáltuk és 0,001% Tween 20 tartalmú foszfáttal pufferolt konyhasó oldatban (PBS) oldottuk fel. A tisztított végtermék TCF-ek kinyert mennyiségét és kihozatalát az 1. táblázat mutatja be. A kinyert mennyiségeket poliklonális EIA segítségével határoztuk meg, a következő fejezetben leírtak szerint.

1. táblázat

Név	Kinyert mennyiség (μg)	Kihozatal (%)
TCF	2760	31
TCF-1	872	17
TCF-2	920	40
TCF-3	253	16
TCF-4	560	16
TCF-12	688	33
TCF-13	1088	23
TCF-14	350	27
TCF-23	810	28
TCF-24	648	19
TCF-34	668	34
TCF-123	340	11

TCF-124	400	23
TCF-134	187	22
TCF-234	400	15
TCF-1234	155	8

(7) A tisztított módosított TCF-ek mennyiségi meghatározása

Poliklonális antitestek előállítása és az antitestek jelzése

Anti-TCF antiszérumot TCF-fel immunizált nyulakból nyertünk. az anti-TCF IgG-t az antiszérumból tisztítottuk Affi-gel protein A Sepharose (BioRad Co.) használatával, a gyártó cég előirata szerint. A tisztított IgG-t egy éjszakán át dializáltuk PBS-sel szemben, majd 0,5 ml/perc átfolyási sebesség mellett TCF affinitás oszlopra vittük, amelyben a TCF-et Affi-gel 10-en (BioRad Co.) immobilizáltuk. Az immobilizált oszlopot PBS-sel mostuk és az anti-TCF IgG-t 0,1 M glicin.Hcl pufferral (pH = 2,5) eluáltuk. Az eluátomot PBS-sel szemben dializáltuk és így tisztított anti-TCF poliklonális antitesteket kaptunk. A peroxidázzal jelzett antitesteket Ishikawa és munkatársai [J. Immunoassay, 4, 209-237 (1983)] szerint készítettük.

2) A tisztított, módosított TCF-ek mennyiségi meghatározása

Anti-TCF antitesteket oldottunk 10 µg/ml koncentrációban, 0,1 M nátrium-hidrogén-karbonát oldatban. Az antitest oldatot 96 tartályos mikrotitráló lemezekre (NUNC Co.: 100 µl/tartály) vittük. A Snow Brand Milk Products Ltd. Co. Block Ace készítményét kétszeresére higítottuk ionmentesített vízzel és hozzáadtuk az antitesttel fedett mikrotitráló lemezek tartályaihoz (2000 µl/ml). A lemezeket egy órán át szobahőmérsékleten tartottuk a tartályok blokkolása céljából. A lemezeket ezután háromszor mostuk 0,1% Tween 20 tartalmú PBS-sel (mosó

puffer). A módosított TCF-et megfelelő mennyiségű első pufferrel (0,2 M Trisz.HCl, pH = 7,4, mely 40% Block Ace készítményt és 0,1% Tween 20-at tartalmaz) higítottuk a módosított TCF minták elkészítése céljából. Standard TCF oldatot úgy kaptunk, hogy a 10 ng/ml koncentrációju TCF oldatból sorozathigítást készítettünk. A módosított TCF mintákból 100 µl-t mértünk a tartályokba, a lemezeket 3 órán át 37°C-on tartottuk, majd háromszor mostuk a mosó pufferrel. A peroxidázzal konjugált antitest oldatot 400-szorosra higítottuk a második pufferrel (0,1 M trisz.HCl, pH = 7,4, mely 20% Block Ace készítményt, 0,1% Tween 20-at és 0,5 mg/ml egér IgG-t tartalmaz). A higított, peroxidázzal jelzett antitest oldatból 100 µl-t mértünk a tartályokba, a lemezeket 2 óra hosszat 37°C-on tartottuk, majd háromszor mostuk a mosó pufferrel. Ezután 100 µl szubsztrátum oldatot (0,4 mg/ml o-fenilén-diamin-dihidroklorid és 0,006% hidrogén-peroxid 0,1 M citrát-foszfát pufferben: pH = 4,5) adtunk a tartályokhoz és a lemezeket 30 percig 37°C-on sötét helyen inkubáltuk. Az enzimreakciót 50 µl 6 n kénsav bemérésével állítottuk le. Az abszorpciót 492 nm-en, Immuno Reader (Corona Co.) készülékkel mértük.

(8) A tisztított TCF vagy a módosított TCF-ek analízise SDS-poliakrilamid-gél-elektroforézissel

A tisztított, módosított TCF-ekből 5 µg-ot vittünk SDS-poliakrilamid gélre. A nagyobb felezési idejű módosított TCF-eket (TCF-3 és TCF-13) - lásd később - és a vad típusú TCF-et SDS-poliakrilamid gélben elektroforetizáltuk. Az eredményeket a 7. ábra mutatja. Az elektroforézist β-merkapto-etanol jelenlétében (redukáló körülmények) is és β-merkapto-etanol nélkül (nem redukáló körülmények) is elvégeztük. A 7. ábrán látható, hogy a TCF két egymás mellett lévő sávot mutat, körülbelüli molekulatömegük 78.000, illetve 74.000, nem redukáló körülmények mellett. A TCF-3 két sávja gyorsabban vándorolt, mint a TCF sávok, és a TCF-13 gyorsabban vándorolt, mint a TCF-3 sávjai, nem-redukáló körülmények mellett. Redukáló körülmények mellett a

TCF esetében három protein sávot észleltünk, melyek molekulatömege 52.000, 30.000 és 26.000 volt. Ehhez hasonlóan a TCF-3-nál három, 52.000, 26.000 és 22.000 molekulatömegű sávot, a TCF-13-nál szintén három, 48.000, 26.000 és 22.000 molekulatömegű sávot észleltünk. E TCF-ek molekulatömegében mutatkozó csökkenés valószínűleg az oligoszacharid láncok eltávolításának tudható be. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy a kívánt, módosított TCF-eket kaptuk meg. Más protein sávokat nem észleltünk, kivéve azokat, amelyek a két módosított protein szerkezetéből következtek.

2. példa

A TCF és a módosított TCF-ek biológiai aktivitása in vitro

(1) Növekedést stimuláló hatás májsejtekre

A májsejtekre gyakorolt növekedést stimuláló hatást a következőképpen határoztuk meg. Wister patkányokból (testtömegük körülbelül 200 g) patkány hepatocitákat izoláltunk Seglen módszerével (Methods in Cell Biology, 13, kötet, 29. oldal., Academic Press, New York). A sejttenyésztéshez Williams E alap-táptalajt (FLOW laboratories Co.) használtunk, amely 10% fetális borju szérumot és 10 μM dexametazont tartalmazott. Egy 96 tartályos (lapos fenekű tartályok) lemez (Falcon Co.) minden tartályába 100 μl 1,0 x 10^4 sejtet tartalmazó alaptáptalajt mértünk be és a lemezeket 37°C-on inkubáltuk. Huszonnégy órás inkubálás után a tartályokba TCF-et vagy módosított TCF-eket mértünk be, majd 22 órán át 37°C-on inkubáltuk a lemezeket. Minden tartályt 1 μCi ^{3}H-timidinnel (Amersham Co.) egészítettünk ki és tovább inkubáltunk 2 óra hosszat 37°C-on. Ezután hideg PBS-sel háromszor mostuk a lemezeket, majd a sejteket 0,5%-os tripszin oldattal kezeltük. Végül a sejteket sejtlearató készülék (cell harvester) segítségével üveg szűrőlemezre gyüjtöttük össze. Az egyes tartályokban lévő sejtek által felvett radioaktivitást Matrix 96 készülékben (Packard Co.) számoltuk. A 8. ábrán látható, hogy mindegyik módosított TCF

megtartotta növekedést stimuláló hatását a patkány hepatocitáknál.

(2) Tumor citotoxikus aktivitás

A TCF, TCF-3 és TCF-13 tumor citotoxikus aktivitását mértük. Meth A szarkóma sejteket használtunk célsejtek gyanánt. A sejteket 10% FCS tartalmú RPMI táptalajban (Gibco Co.) szuszpendáltuk 2 x 10^4 sejt/ml végső sejt sűrűségben. Ezután 96 tartályos (lapos fenekű tartályok) mikrotitráló lemezek tartályait a sejtszuszpenziók 50 µl-eivel oltottuk be. A tisztított TCF, TCF-3 és TCF-13 50 ng/ml koncentrációjú oldataiból sorozathigításokat készítettünk RPMI táptalajjal, majd minden higításból 50 µl-t mértünk a tartályokba. A lemezeket 5 napig inkubáltuk 37°C-on, majd annyi MTT-t [tiazolil kék: 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromid] adtunk a tartályokhoz, hogy végső koncentrációja 0,5 mg/ml legyen. Ezután a lemezeket 37°C-on inkubáltuk. Négy órával később 10% SDS és 0,01M ammónium-klorid tartalmú oldatból minden tartályba 100 µl-t mértünk be és egy éjszakán át szobahőmérsékleten tartottuk a lemezeket. A következő nap minden tartályban 620 nm-en mértük az abszorpciót, mint az élő sejtszám paraméterét. A 9. ábra mutatja be a kísérlet eredményét. A TCF, TCF-3 és TCF-13 citotoxikus aktivitását dózis függő módon fejti ki a Meth A sejtekre.

3. példa

A TCF és a módosított TCF-ek biológiai felezési idejének mérése in vivo

Anti-TCF poliklonális antitest oldatot készítettünk 0,1 M nátrium-hidrogén-karbonát oldatban úgy, hogy végső koncentrációja 10 µg/ml legyen. Az antitest oldatból 100 µl-t mértünk a lemezeken lévő tartályokba és a lemezeket szobahőmérsékleten tartottuk egy éjszakán át. A tartályokat megtöltöttük Block Ace 50%-os vizes oldatával, 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd háromszor mostuk mosó oldattal (0,1% Tween 20-at tartalmazó PBS). Patkányokból,

amelyeket intravénásan oltottunk TCF-fel vagy módosított TCF-ekkel időközönként plazma mintákat vettünk. A plazmákat normál patkány szérummal higítottuk, ha ez szükséges volt. Normál patkány szérummal sorozat higítást készítettünk a TCF oldatokból (10 ng/ml-től), s ezt használtuk standard TCF oldatként. Minden tartályhoz hozzáadtunk egy keveréket, mely 50 µl minta oldatból és 50 µl első pufferből (50% Block Ace, 0,2 M nátrium-klorid, 0,1% Tween 20, 0,2% CHAPS, 20 mM benzamidin-hidroklorid és 10 mM EDTA tartalmú 0,2 M trisz.HCl, pH = 7,3) állt. A lemezeket 3 órán át 37°C-on tartottuk, majd háromszor mostuk a mosó pufferrel. A tartályokhoz hozzáadtunk 100 µl peroxidázzal konjugált anti-TCF oldatot, melyet 400-szorosára higítottunk 10% Block Ace, 0,15 M nátrium-klorid, 0,1% Tween 20, 4% patkány szérum és 0,5% egér IgG tartalmú 0,1 M foszfát pufferrel (pH = 7,0). A lemezeket 2 órán át 37°C-on inkubáltuk, ezután háromszor mostuk mosó pufferrel. Ezután minden tartályba 100 µl szubsztrátum olddatot (0,4 mg/ml o-fenilén-diamin-dihidroklorid és 0,006% hidrogén-peroxid 0,1 M citrát-foszfát pufferben: pH = 4,5) mértünk és a lemezeket sötét helyen 37°C-on 30 percig inkubáltuk. Az enzimreakciót 50 µl 6 n kénsav hozzáadásával állítottuk le. Az abszorpciót 492 nm-en mértük Immuno Reader (Corona Co.) készülékben. Igy határoztuk meg a TCF vagy a módosított TCF-ek koncentrációját a patkány szérumokban.

A plazma szintek időben való változását EIA-val mértük patkányokban, egyetlen TCF vagy módosított TCF intravénás injekciója után. Körülbelül 200 g-os hím Wister patkányokat használtunk. A patkányokba intravénásan beoltott TCF plazma-szintje biexponenciálisan csökken, melyet egy két-kompartmentumos modell jól leír. Ötven µg/kg TCF inkekciója után a patkányok plazmájában a felezési idő a gyors fázisban és a lassú fázisban a következő volt: 2,4 ± 2,5 perc ($t^1/2\alpha$), illetve 15,6 ±4,6 perc ($t^1/2\beta$). A módosított TCF plazma szintek profilja hasonló volt a vad típusú TCF-éhez, de ezeknél a plazma szintek lassabban csökkentek, mint a vad típusú TCF-nél, azonos dózisok intravénás injekciója után.

A 2. táblázat mutatja, hogy a TCF-3 és a TCF-13 plazma felezési ideje hosszabb és teljes klirenszük csökkent. A TCF-3 és a TCF-13 esetén szélesebb az AUC (the area under the plasma concentration - time curve = a plazma-koncentráció alatti terület - idő görbe), összehasonlítva a vad típusú TCF-fel.

2. táblázat

A módosított TCF-ek farmakokinetikai paraméterei

Minta	$t^1/2\,\alpha$ (perc)	$t^1/2\,\beta$ (perc)
TCF	2.4 ± 0,5	15,6 ± 4,6
TCF-1	2,4 ± 0,3	19,6 ± 0,3
TCF-2	2,2 ± 0,6	18,2 ± 2,5
TCF-3	2,9 ± 0,3	54,2 ± 8,3**
TCF-4	2,7 ± 0,1	20,6 ± 3,3
TCF-12	2,7 ± 0,3	18,1 ± 1,6
TCF-13	3,8 ± 0,5**	24.9 ± 3,1*
TCF-14	1,9 ± 0,4	18,8 ± 2,9
TCF-23	2,4 ± 0,5	15,4 ± 0,5
TCF-24	2,3 ± 0,1	16,9 ± 1,7
TCF-34	2,2 ± 0,5	18,0 ± 2,1
TCF-123	2,2 ± 0,1	17,2 ± 0,8
TCF-124	2,3 ± 0,1	15,7 ± 2,7
TCF-134	2,3 ± 0,4	19,1 ± 3,2
TCF-234	2,6 ± 0,6	16,8 ± 1,6
TCF-1234	2,9 ± 0,1*	24,2 ± 5,5*

Középérték: ± SD

A vad típusú TCF-től szignifikánsan különbözik (*P $<$ 0,05, **P $<$ 0,01)

3. táblázat

A módosított TCF-ek farmakokinetikai paraméterei

Minta	AUC (ng.perc/ml)	$CL_{összes}$ (ml/perc/kg)
TCF	1030,0 ± 257,9	51,5 ± 13,9
TCF-1	811,6 ± 158,3	63,2 ± 12,2
TCF-2	1143,7 ± 551,7	49,8 ± 18,9
TCF-3	2679,5 ± 292,1**	18,8 ± 2,1**
TCF-4	897,8 ± 263,5	58,6 ± 14,7
TCF-12	1246,4 ± 290,8	41,7 ± 10,6
TCF-13	8301,0 ± 279,7**	6,0 ± 0,2**
TCF-14	972,5 ± 162,2	52,5 ± 9,5
TCF-23	1223,0 ± 356,7	43,6 ± 14,3
TCF-24	1017,8 ± 210,0	51,0 ± 8,3
TCF-34	983,0 ± 61,0	51,0 ± 3,2
TCF-123	963,8 ± 66,2	52,0 ± 3,5
TCF-124	1126,3 ± 265,0	45,9 ± 9,5
TCF-134	960,9 ± 279,7	55,2 ± 16,7
TCF-234	892,9 ± 119,7	56,6 ± 7,1
TCF-1234	1266,5 ± 78,9	39,6 ± 2,6

Középérték ± SD
A vad tipusú TCF-től szignifikánsan különbözik
(*P < 0,05, ** P < 0,01)

Az eredmények azt mutatják, hogy a TCF-3 és a TCF-13 lassabban metabolizálódik, mint a vad típusú TCF és szélesebb a biológiai hozzáférhetősége, mint a vad típusú TCF-é.

A TCF-3 aminosavszekvenciáját a 2. sz. szekvenciavázlat tartalmazza és a TCF-13 szekvenciáját a 3. sz. szekvenciavázlat tartalmazza.

A találmány szerinti módosított TCF-ek biológiai

felezési ideje hosszabb, amellett megtartották növekedést stimuláló aktivitásukat a hepatocitákra és citotoxikus aktivitásukat a tumor sejtekkel szemben. Ennélfogva májbetegségeknél mint gyógyszerek, továbbá mint rákellenes szerek használhatók.

LETÉTBE HELYEZETT MIKROORGANIZMUSOK

(1) pcTCF(S)MC1061/P3
Letét helye:
National Institute of Bioscience and Human Technology,
Agency of Industrial Science and Technology,
Ministry of International Trade and Industry
Címe:
1-3, Higashi 1 chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japán
Letéti szám: FERM BP-3479

(2) pBVP-TCF-3
Letét helye: u.a.
Letéti szám: FERM BP-44354

(3) pBPV-TCF-13
Letét helye: u.a.
Letéti szám: FERM BP-4455

SZEKVENCIÁK

1. sz. szekvenciavázlat
A szekvencia hossza: 723 aminosav
A szekvencia típusa: aminosavszekvencia
Molekula típus: protein

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
20 25 30

Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
35 40 45

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
50 55 60

Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
65 70 75 80

Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
85 90 95

Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
100 105 110

Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
115 120 125

Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
130 135 140

Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
145 150 155 160

Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg
165 170 175

Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg
180 185 190

Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr
195 200 205

Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly
210 215 220

Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe
225 230 235 240

Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg
245 250 255

Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His
260 265 270

Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met
275 280 285

Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln
290 295 300

Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro
305 310 315 320

Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro
325 330 335

Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
340 345 350

Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg
355 360 365

Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln
370 375 380

Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln
385 390 395 400
Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp
405 410 415
Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu
420 425 430
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr
435 440 445
Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys
450 455 460
Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile
465 470 475 480
Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr
485 490 495
Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His
500 505 510
Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg
515 520 525
Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly
530 535 540
Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu
545 550 555 560
Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu
565 570 575
Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile
580 585 590
Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser
595 600 605

Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu
610 615 620

Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His
625 630 635 640

His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala
645 650 655

Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu
660 665 670

Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro
675 680 685

Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val
690 695 700

Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val
705 710 715 720

Pro Gln Ser

2. sz. szekvenciavázlat
A szekvencia hossza: 723 aminosav
A szekvencia típusa: aminosavszekvencia
Molekula típus: protein

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
1 5 10 15
Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
20 25 30
Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
35 40 45
Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
50 55 60
Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
65 70 75 80
Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
85 90 95
Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
100 105 110
Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
115 120 125
Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
130 135 140
Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
145 150 155 160
Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg
165 170 175

Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg
180 185 190

Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr
195 200 205

Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly
210 215 220

Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe
225 230 235 240

Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg
245 250 255

Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His
260 265 270

Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met
275 280 285

Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln
290 295 300

Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro
305 310 315 320

Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro
325 330 335

Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
340 345 350

Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg
355 360 365

Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln
370 375 380

Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln
385 390 395 400

Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp
405 410 415

Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu
420 425 430

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr
435 440 445

Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys
450 455 460

Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile
465 470 475 480

Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr
485 490 495

Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His
500 505 510

Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg
515 520 525

Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly
530 535 540

Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu
545 550 555 560

Asn Val Ala Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu
565 570 575

Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile
580 585 590

Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser
595 600 605

Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu
610 615 620

Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His
625 630 635 640
His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala
645 650 655
Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu
660 665 670
Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro
675 680 685
Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val
690 695 700
Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val
705 710 715 720
Pro Gln Ser

3. sz. szekvenciavázlat
A szekvencia hossza: 723 aminosav
A szekvencia típusa: aminosavszekvencia
Molekula típus: protein

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu
1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln
20 25 30

Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr
35 40 45

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val
50 55 60

Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
65 70 75 80

Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys
85 90 95

Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe
100 105 110

Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
115 120 125

Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
130 135 140

Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
145 150 155 160

Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg
165 170 175

Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg
180 185 190

Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr
195 200 205

Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly
210 215 220

Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe
225 230 235 240

Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg
245 250 255

Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His
260 265 270

Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met
275 280 285

Gln Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln
290 295 300

Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro
305 310 315 320

Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro
325 330 335

Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
340 345 350

Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg
355 360 365

Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln
370 375 380

Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln
385 390 395 400

Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp
405 410 415

Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu
420 425 430

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr
435 440 445

Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys
450 455 460

Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile
465 470 475 480

Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr
485 490 495

Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His
500 505 510

Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg
515 520 525

Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly
530 535 540

Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu
545 550 555 560

Asn Val Ala Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu
565 570 575

Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile
580 585 590

Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser
595 600 605

Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu
610 615 620

Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His
625 630 635 640
His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala
645 650 655
Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu
660 665 670
Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro
675 680 685
Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val
690 695 700
Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val
705 710 715 720
Pro Gln Ser

Szabadalmi igénypontok

1. Módosított TCF-ek, azzal jellemezve, hogy azokat az aminosavcsoportokat, amelyek a nitrogénen keresztül kapcsolódó oligoszacharid láncok megkötéséért felelősek, úgy vannak módosítva, hogy legalább egy nitrogénen keresztül kapcsolódó oligoszacharid lánc TCF-hez való kötődése meg van gátolva.

2. Az 1. igénypont szerinti módosított TCF-ek, azzal jellemezve, hogy az N-glükozileződésért felelős csoportok egyike más aminosavcsoportokkal úgy van szubsztituálva, hogy a nitrogénen keresztül kapcsolódó oligoszacharid lánc (láncok) meg van(nak) gátolva abban, hogy az 1. sz. szekvenciavázlat szerinti aminosavszekvencia N-terminális végétől számított 289., 397., 561. és/vagy 648. helyen lévő Asn csoporthoz kötődjé(ene)k.

3. Az 1. igénypont szerinti módosított TCF, azzal jellemezve, hogy az 563. helyen lévő Ser csoport Ala csoporttal van szubsztituálva.

4. Az 1. igénypont szerinti módosított TCF, azzal jellemezve, hogy a 289. helyen lévő Asn csoport Gln csoporttal és az 563. helyen lévő Ser csoport Ala csoporttal van szubsztituálva.

5. Módosított TCF, azzal jellemezve, hogy egy olyan glükoprotein, amelyet a 2. sz. szekvenciavázlat szerinti aminosavszekvenciát kódoló DNS szekvencia fejez ki.

6. Módosított TCF, azzal jellemezve, hogy egy olyan glükoprotein, amelyet a 3. sz. szekvenciavázlat szerinti aminosavszekvenciát kódoló DNS fejez ki.

39 old.
11 ábra oldal
50
jell ábra Ø

A meghatalmazott
GÖDÖLLE, KERTÉSZ, MÉSZÁROS & SZABÓ
Szabadalmi és védjegy Iroda
1024 Budapest, Keleti Károly u. 13/b
Mészáros Enikő
szabadalmi ügyvivő

2417/94

95/

1. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY 68170

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu
Gly Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys
Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp
Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu
Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln
Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly
Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr Cys Asn
Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe
Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp
Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys
Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His
Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys
Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn
Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His
Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly
Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile
Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn
Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu
Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu
Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr
Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr
Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly
Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro Gly Arg
Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val
Pro Gln Ser

GÖDÖLLE, KEKES, MÉSZÁROS & SZABÓ
Szabadalmi és Védjegy Iroda
1024 Budapest, Keleti Károly u. 13/b
Mészáros Enikő
szabadalmi ügyvivő

---------- ---------- ---------- ---------- ---TAGGCAC TGACTCCGAA

GAGGATTCTT TCACCCAGGC ATCTCCTCCA GAGGGATCCC CCAGCCCCTC CAGCAGCACC

ATGTGGGTGA CCAAACTCCT GCCAGCCCTC CTGCTGCAGC ATGTCCTCCT GCATCTCCTC

CTGCTCCCCA TCGCCATCCC CTATGCAGAG GGACAAAGGA AAAGAAGAAA TACAATTCAT

GAATTCAAAA AATCAGCAAA GACTACCCTA ATCAAAATAG ATCCAGCACT GAAGATAAAA

ACCAAAAAAG TGAATACTGC AGACCAATGT GCTAATAGAT GTACTAGGAA TAAAGGACTT

CCATTCACTT GCAAGGCTTT TGTTTTTGAT AAAGCAAGAA AACAATGCCT CTGGTTCCCC

TTCAATAGCA TGTCAAGTGG AGTGAAAAAA GAATTTGGCC ATGAATTTGA CCTCTATGAA

AACAAAGACT ACATTAGAAA CTGCATCATT GGTAAAGGAC GCAGCTACAA GGGAACAGTA

TCTATCACTA AGAGTGGCAT CAAATGTCAG CCCTGGAGTT CCATGATACC ACACGAACAC

AGCTATCGGG GTAAAGACCT ACAGGAAAAC TACTGTCGAA ATCCTCGAGG GGAAGAAGGG

GGACCCTGGT GTTTCACAAG CAATCCAGAG GTACGCTACG AAGTCTGTGA CATTCCTCAG

TGTTCAGAAG TTGAATGCAT GACCTGCAAT GGGGAGAGTT ATCGAGGTCT CATGGATCAT

ACAGAATCAG GCAAGATTTG TCAGCGCTGG GATCATCAGA CACCACACCG GCACAAATTC

TTGCCTGAAA GATATCCCGA CAAGGGCTTT GATGATAATT ATTGCCGCAA TCCCGATGGC

CAGCCGAGGC CATGGTGCTA TACTCTTGAC CCTCACACCC GCTGGGAGTA CTGTGCAATT

AAAACATGCG CTGACAATAC TATGAATGAC ACTGATGTTC CTTTGGAAAC AACTGAATGC

ATCCAAGGTC AAGGAGAAGG CTACAGGGGC ACTGTCAATA CCATTTGGAA TGGAATTCCA

TGTCAGCGTT GGGATTCTCA GTATCCTCAC GAGCATGACA TGACTCCTGA AAATTTCAAG

TGCAAGGACC TACGAGAAAA TTACTGCCGA AATCCAGATG GGTCTGAATC ACCCTGGTGT

TTTACCACTG ATCCAAACAT CCGAGTTGGC TACTGCTCCC AAATTCCAAA CTGTGATATG

TCACATGGAC AAGATTGTTA TCGTGGGAAT GGCAAAAATT ATATGGGCAA CTTATCCCAA

ACAAGATCTG GACTAACATG TTCAATGTGG GACAAGAACA TGGAAGACTT ACATCGTCAT

ATCTTCTGGG AACCAGATGC AAGTAAGCTG AATGAGAATT ACTGCCGAAA TCCAGATGAT

GATGCTCATG GACCCTGGTG CTACACGGGA AATCCACTCA TTCCTTGGGA TTATTGCCCT

ATTTCTCGTT GTGAAGGTGA TACCACACCT ACAATAGTCA ATTTAGACCA TCCCGTAATA

TCTTGTGCCA AAACGAAACA ATTGCGAGTT GTAAATGGGA TTCCAACACG AACAAACATA

GGATGGATGG TTAGTTTGAG ATACAGAAAT AAACATATCT GCGGAGGATC ATTGATAAAG

GAGAGTTGGG TTCTTACTGC ACGACAGTGT TTCCCTTCTC GAGACTTGAA AGATTATGAA

GCTTGGCTTG GAATTCATGA TGTCCACGGA AGAGGAGATG AGAAATGCAA ACAGGTTCTC

AATGTTTCCC AGCTGGTATA TGGCCCTGAA GGATCAGATC TGGTTTTAAT GAAGCTTGCC

AGGCCTGCTG TCCTGGATGA TTTTGTTAGT ACGATTGATT TACCTAATTA TGGATGCACA

ATTCCTGAAA AGACCAGTTG CAGTGTTTAT GGCTGGGGCT ACACTGGATT GATCAACTAT

GATGGCCTAT TACGAGTGGC ACATCTCTAT ATAATGGGAA ATGAGAAATG CAGCCAGCAT

CATCGAGGGA AGGTGACTCT GAATGAGTCT GAAATATGTG CTGGGGCTGA AAAGATTGGA

TCAGGACCAT GTGAGGGGGA TTATGGTGGC CCACTTGTTT GTGAGCAACA TAAAATGAGA

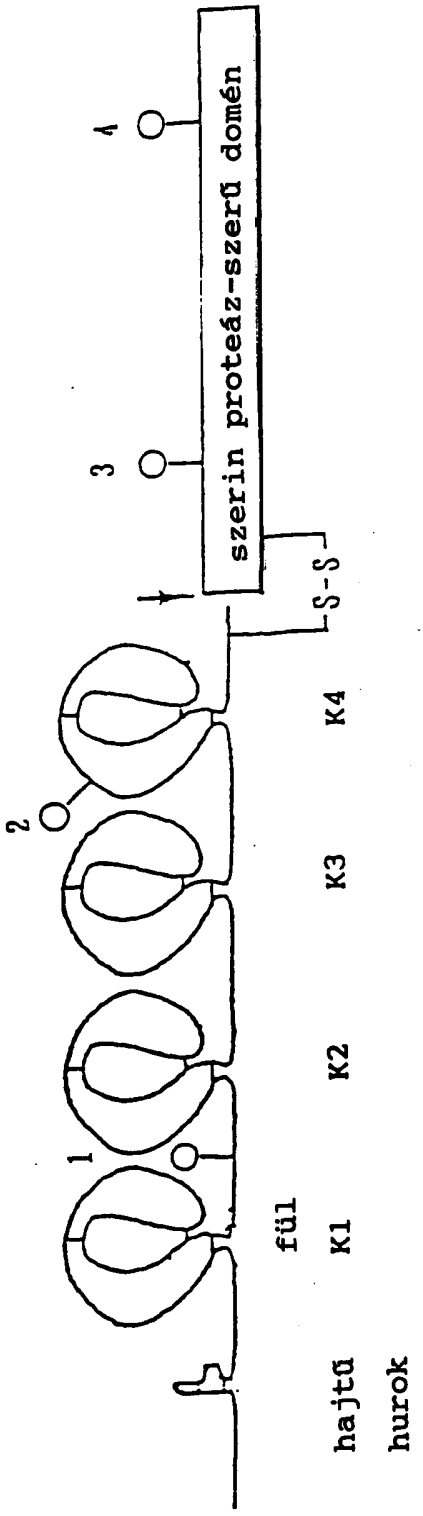
ATGGTTCTTG GTGTCATTGT TCCTGGTCGT GGATGTGCCA TTCCAAATCG TCCTGGTATT

TTTGTCCGAG TAGCATATTA TGCAAAATGG ATACACAAAA TTATTTTAAC ATATAAGGTA

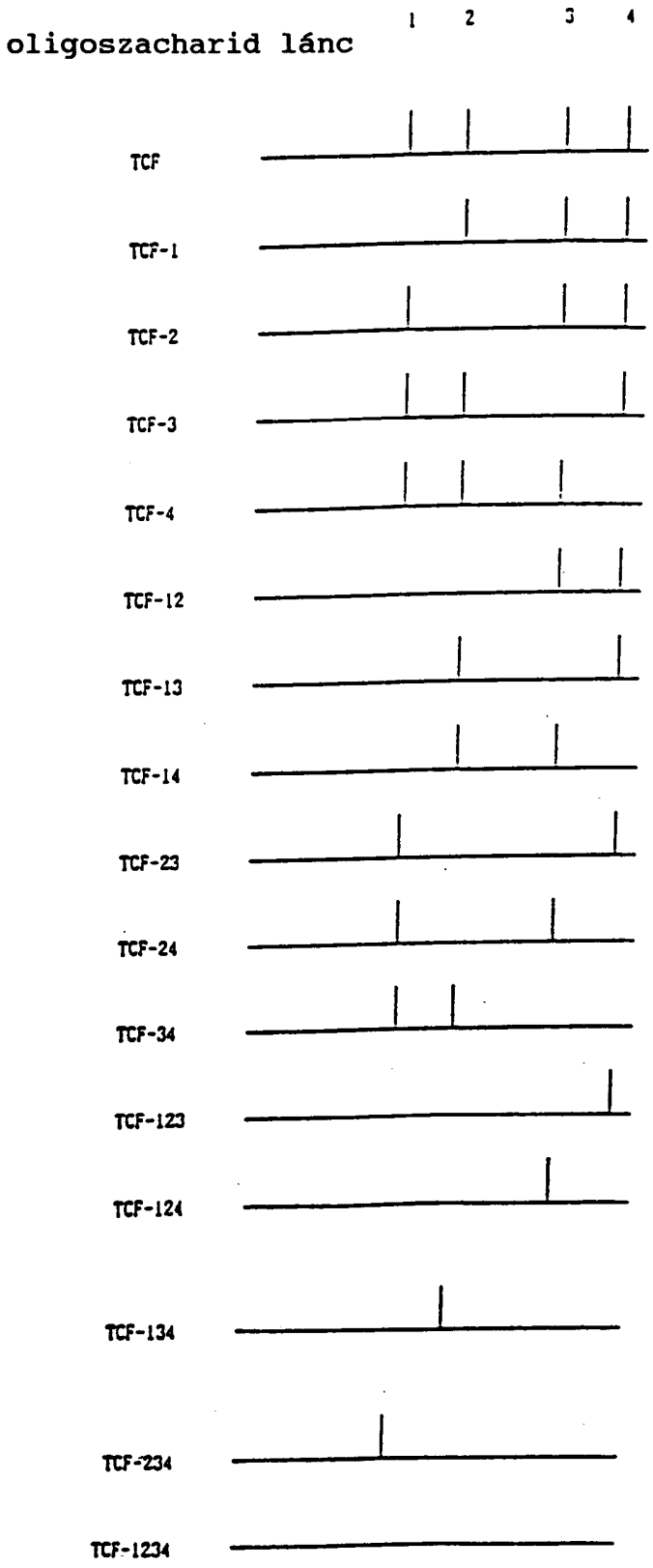
CCACAGTCAT AGCTGAAGTA AGTGTGTCTG AAGCACCCAC CAATACAACT GT

GÖDÖLLE, KÉKES, MÉSZÁROS & SZABÓ
Szabadalmi és Védjegy Iroda
1024 Budapest, Keleti Károly u. 13/b
Mészáros Enikő
szabadalmi ügyvivő

3. ábra

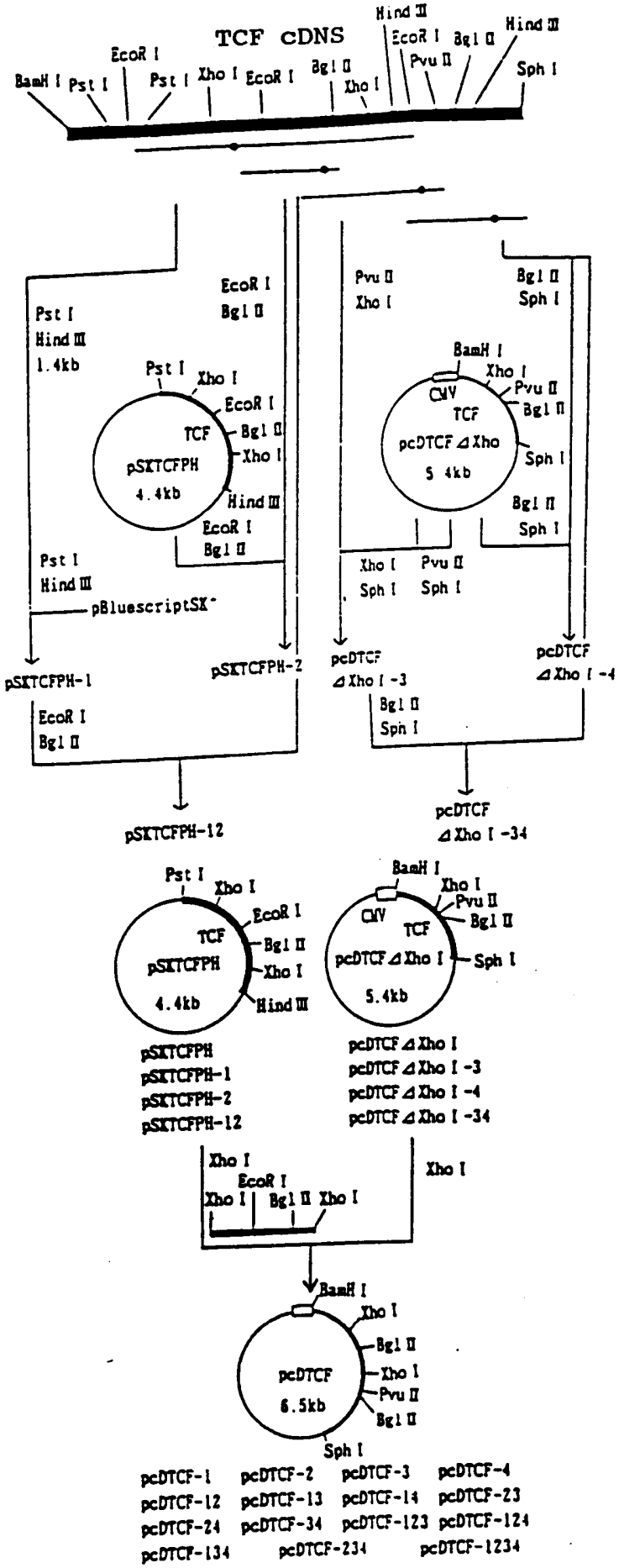


GÖDÖLLE, KERESZTÚRI, MESZÁROS & SZABÓ
Szabadalmi és Védjegy Iroda
1024 Budapest, Keleti Károly u. 13/b
Mészáros Enikő
szabadalmi ügyvivő



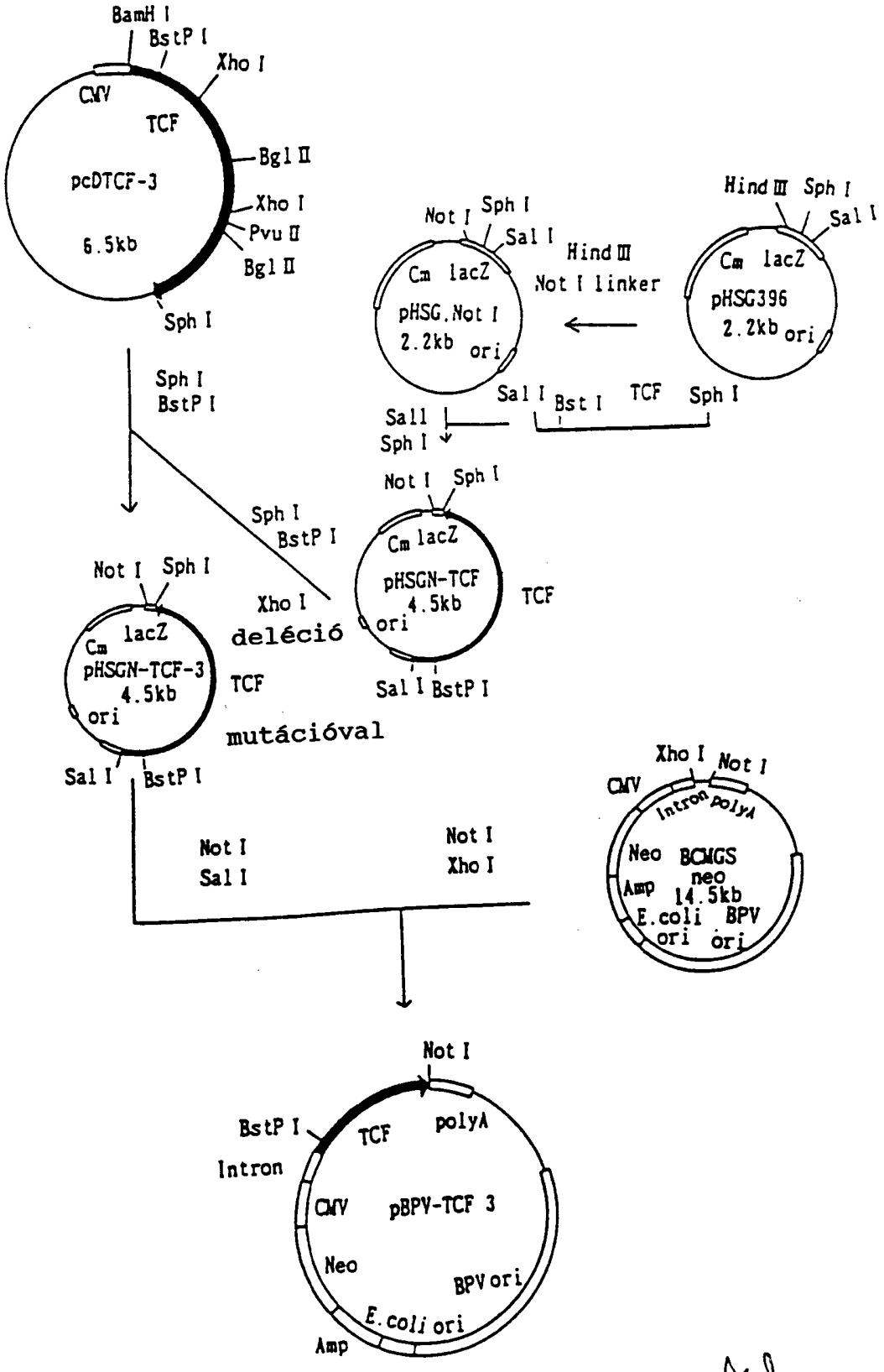
GÖDÖLLE, KERESS, MESZÁROS & SZABÓ
Szabadalmi és Védjegy Iroda
1024 Budapest, Keleti Károly u. 13/b
Mészáros Enikő
szabadalmi ügyvivő

5. ábra



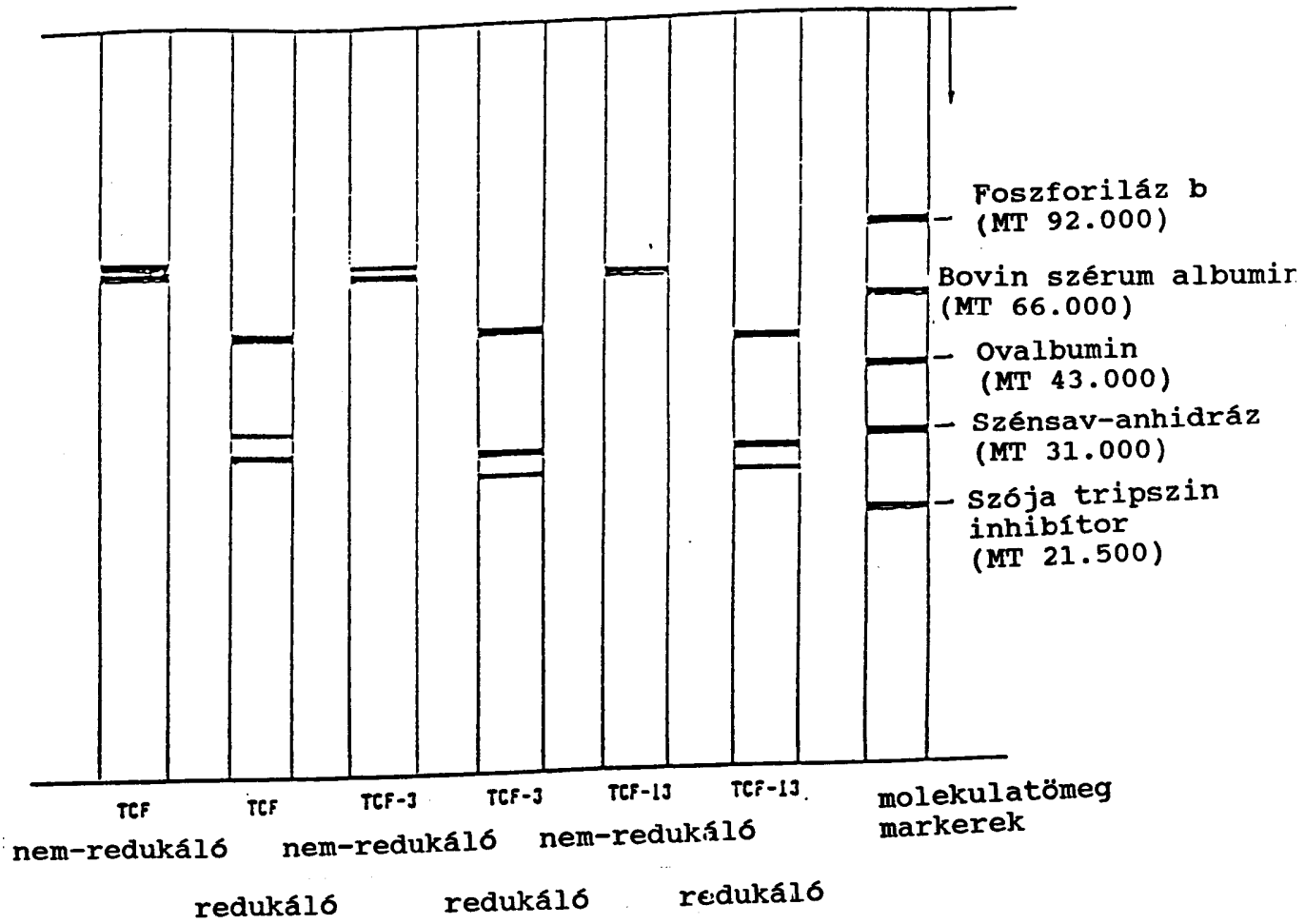
GÖDÖLLE, KÉKES, MESZÁROS & SZABÓ
Szabadalmi és Védjegy Iroda
1024 Budapest, Keleti Károly u. 13/b
Mészáros Enikő
szabadalmi ügyvivő

6. ábra



GÖDÖLLE, KÉKES, MÉSZÁROS & SZABÓ
Szabadalmi és Védjegy Iroda
1024 Budapest, Keleti Károly u. 13/b
Mészáros Enikő
szabadalmi ügyvivő

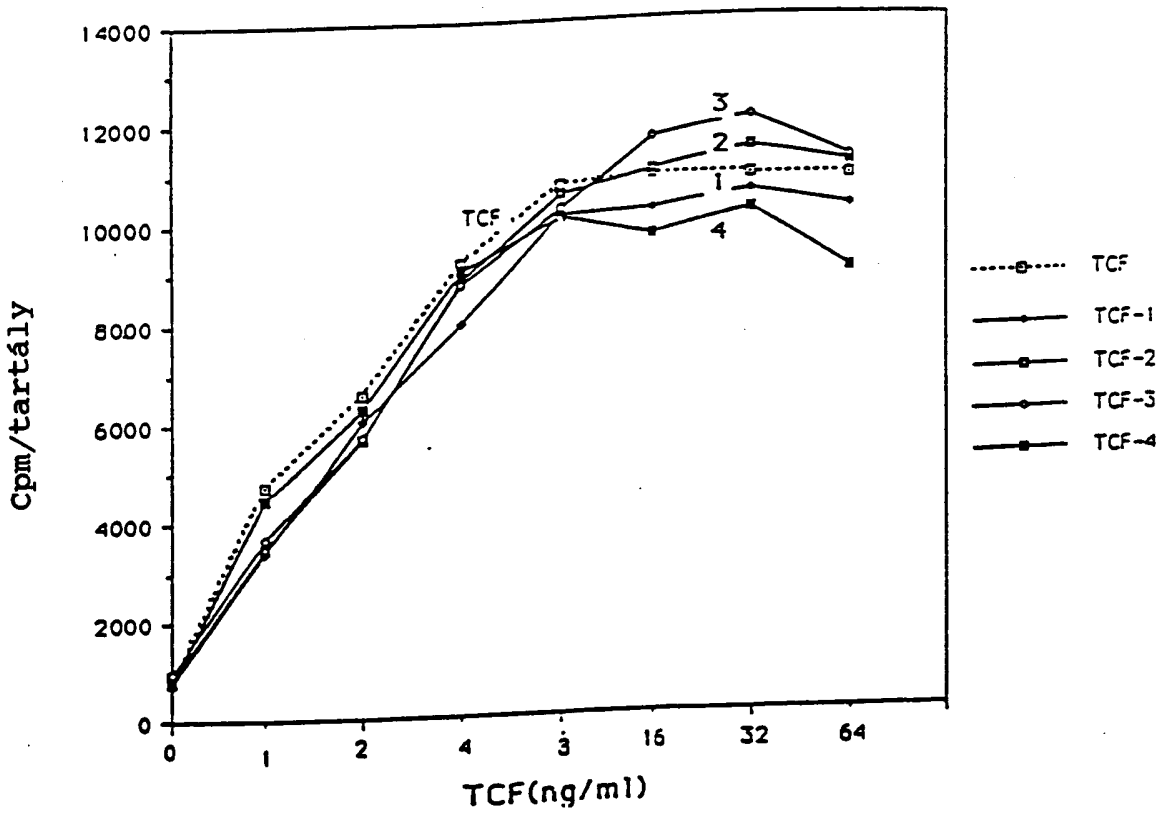
7. ábra



GÖDÖLLE, KÉKES, MÉSZÁROS & SZABÓ
Szabadalmi és Védjegy Iroda
1024 Budapest, Keleti Károly u. 13/b
Mészáros Enikő
szabadalmi ügyvivő

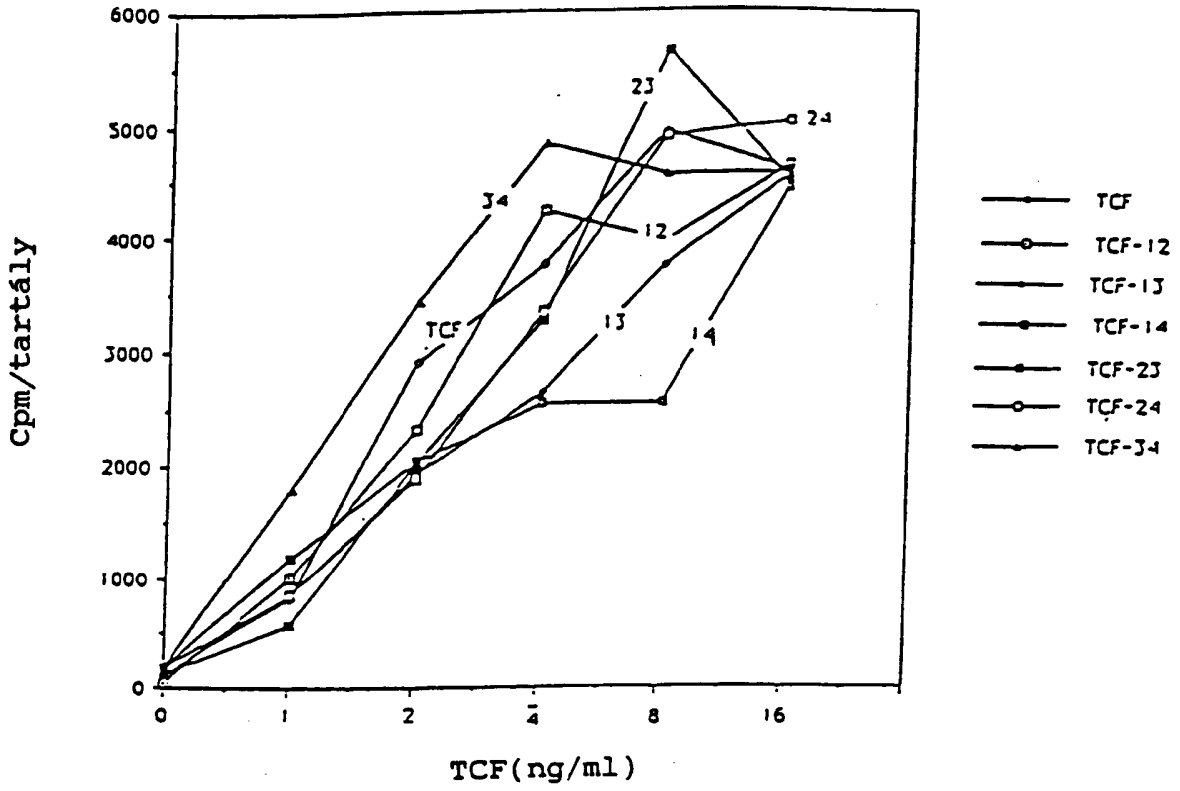
8. ábra

(1)

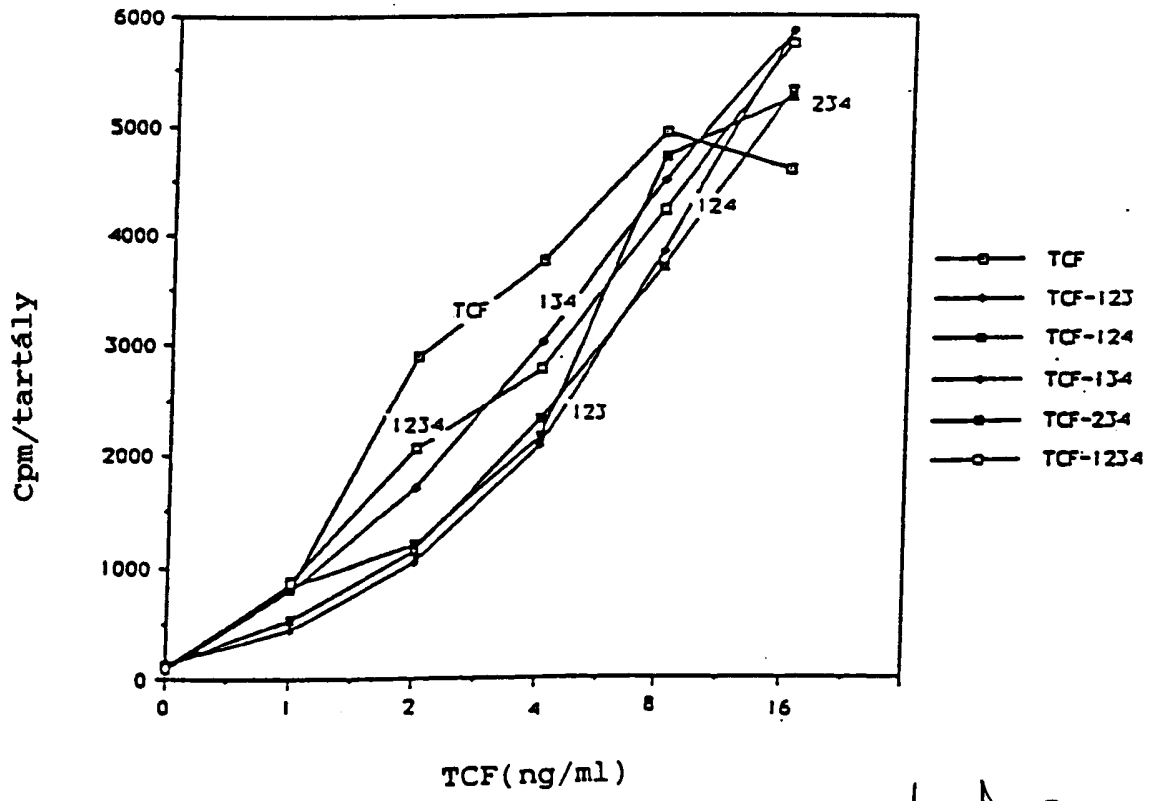


GÖDÖLLE, KÉKES, MÉSZÁROS & SZABÓ
Szabadalmi és Védjegy Iroda
1024 Budapest, Keleti Károly u. 13/b
Mészáros Enikő
szabadalmi ügyvivő

(2)

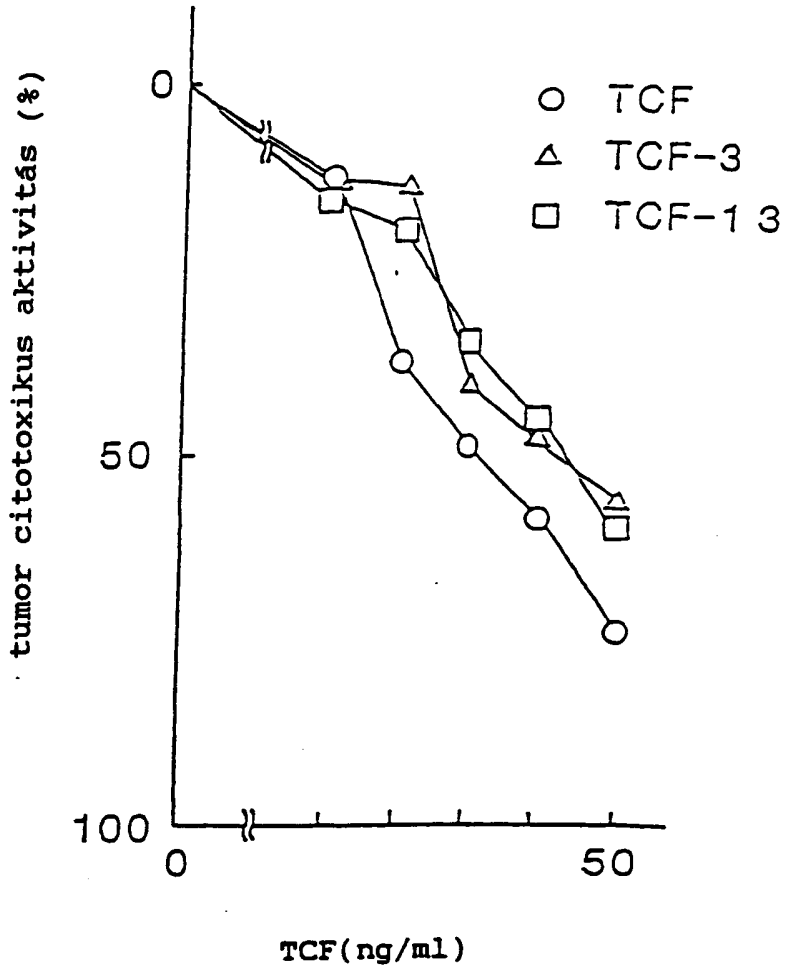


(3)



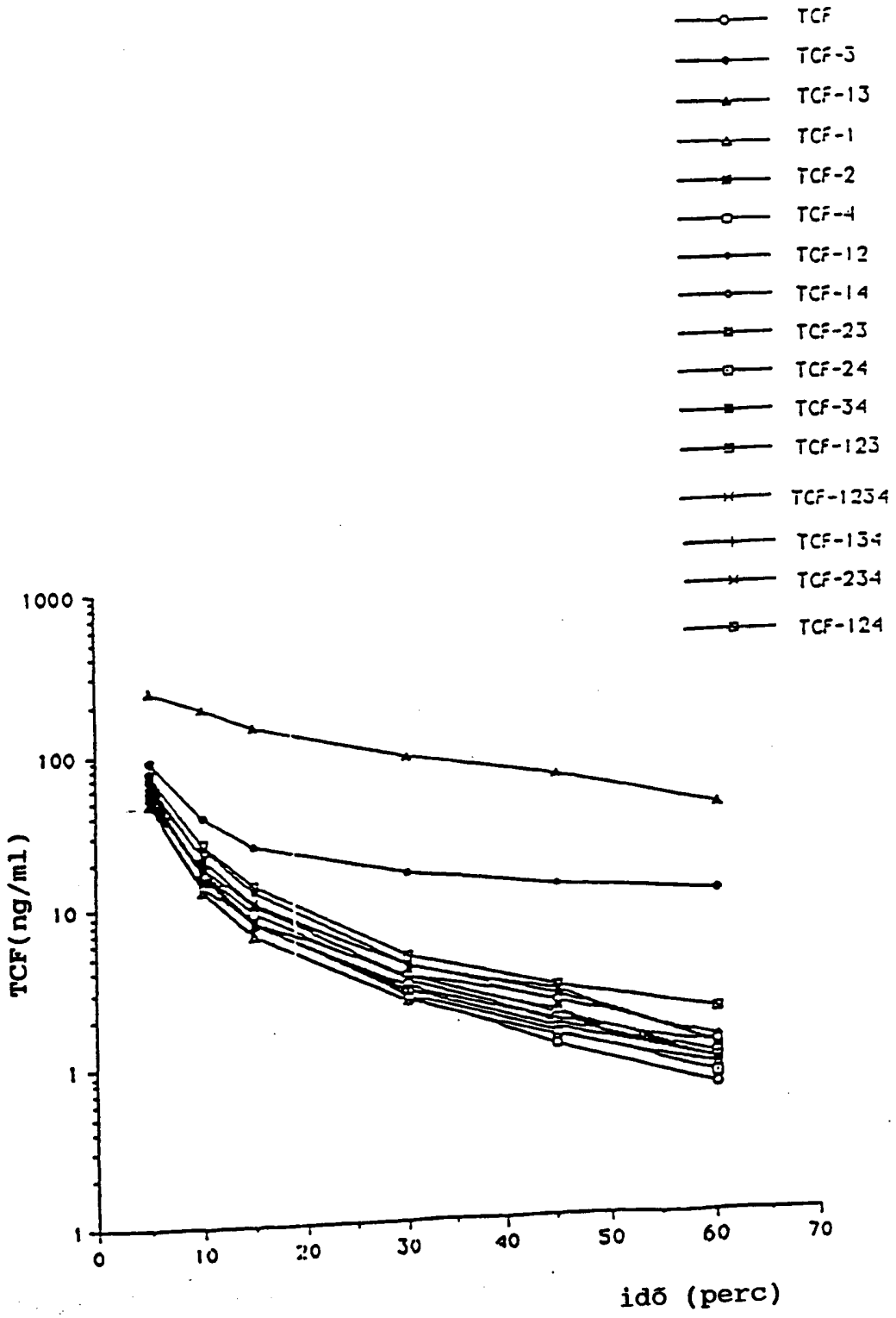
GÖDÖLLE, KÉKES, MÉSZÁROS & SZABÓ
Szabadalmi és Védjegy Iroda
1024 Budapest, Keleti Károly u. 13/b
Mészáros Enikő
szabadalmi ügyvivő

9. ábra



GÖDÖLLE, KÉKES, MÉSZÁROS & SZABÓ
Szabadalmi és Védjegy Iroda
1024 Budapest, Keleti Károly u. 13/b
Mészáros Enikő
szabadalmi ügyvivő

10. ábra



GÖDÖLLE, KÉKES, MESZÁROS & SZABÓ
Szabadalmi és Védjegy Iroda
1024 Budapest, Keleti Károly u. 13/b
Mészáros Enikő
szabadalmi ügyvivő