

ÚJ OLDHATÓ PROTEINVEGYÜLETEK

SMITHKLINE BEECHAM PLC,

Brentford, Middlesex, GB

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION,

Philadelphia, PA, US

A bejelentés napja: 1995. 07. 28.

Az elsőbbség napja: 1994. 07. 29.

(9415379.8 GB)

1995. 06. 06.

(08/468,297 US)

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP95/03036

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/04388

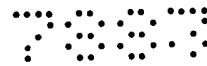
KIVONAT

A találmány IL4 és/vagy IL13 antagonistá vagy részleges antagonistá aktivitással rendelkező, oldható proteinre vonatkozik, amely egy IL4 mutánst vagy variánst tartalmaz legalább egy humán immunglobulin konstans szakaszhoz vagy ennek egy fragmentumához kapcsolva.

P9700260

63.411/DE

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



KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

A

ÚJ OLDHATÓ PROTEINVEGYÜLETEK

SMITHKLINE BEECHAM PLC,

Brentford, Middlesex, GB

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION,

Philadelphia, PA, US

Feltalálók:

BROWNE, Michael, Joseph,

Harlow, Essex, GB

MURPHY, Kay, Elizabeth,

Harlow, Essex, GB

CHAPMAN, Conrad, Gerald,

Harlow, Essex, GB

CLINKENBEARD, Helen, Elizabeth,

Harlow, Essex, GB

YOUNG, Peter, Ronald,

King of Prussia, PA, US

SHATZMAN, Allan, Richard,

King of Prussia, PA, US

A bejelentés napja: 1995. 07. 28.

Az elsőbbség napja: 1994. 07. 29.

(9415379.8 GB)

1995. 06. 06.

(08/468,297 US)

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP95/03036

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/04388

A találmány a humán interleukin 4 (IL4) és/vagy a humán interleukin 13 (IL13) olyan antagonistáira vonatkozik, amelyek az IL4 és/vagy az IL13 nemkívánatos hatásaiból származó állapotok, például bizonyos IgE által közvetített allergiás betegségek, T-sejt által közvetített autoimmun állapotok és fertőző anyagokra adott nem megfelelő immunválaszok kezelésére alkalmazhatók.

Az interleukinok az immunválasz szekréciós peptid mediátorai. Az ismert interleukinok mindegyikének többféle hatása van az immunrendszer sejtjeinek fejlődésére, aktivációjára, proliferációjára és differenciálódására. Az IL4 fiziológiai szerepet játszik ezekben a funkciókban, de hozzájárulhat a betegség patogeneziséhez is. Az IL4 a B lymphocytá fejlődés folyamatához kapcsolódva olyan IgE antitestek kialakulását eredményezi, amelyek bizonyos allergiás megbetegedések, például az extrinzikus asztma, a rhinitis, az allergiás conjunctivitis, az atopikus dermatitis és az anaphylaxis jellegzetes tüneteit okozzák. Az IL4 ezenkívül a T-lymphocyták esetén általános növekedési és differenciálódási faktorként is működhet, ami bizonyos autoimmun állapotokban, például inzulinfüggő diabetesben, sclerosis multiplexben és rheumatoid arthritisben, valamint a graft rejectióban elősegítheti a szövetkárosodást. Az IL4 a fertőzőes megbetegedések leküzdéséhez szükséges sejtmediált válaszok kialakulását is visszaszoríthatja. Az IL4 esetén a T- vagy B-lymphocytákra gyakorolt hatás antagonizálása ezért várhatóan előnyösen befolyásolja az ilyen jellegű betegségeket. Az IL13-at az közelmúltban azonosították, és megállapították, hogy számos bio-



lógiai jellemzője hasonlít az IL4 tulajdonságaihoz [Minty, A. et al., NATURE, 362, 248-250 (1993)]; ezek közé a hasonló jellemzők közé tartoznak — egyebek mellett — például a receptor-szerkezet/funkció összefüggés bizonyos aspektusai [Aversa, G. et al., J. EXP. MED., 178, 2213-2218 (1993)].

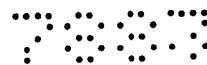
A humán IL4 egy 2 lehetséges N-glikozilezési hellyel és 6 ciszteinnel rendelkező, 3 diszulfid hidat tartalmazó, 129 aminosavból felépülő egyetlen polipeptidláncból áll [Le, H. V. et al., J. BIOL. CHEM., 263, 10817-10823 (1988)]. Az IL4 aminosav-szekvenciája és az említett hidrogénhidak pozíciói ismertek [Carr, C. et al., BIOCHEMISTRY, 30, 1515-1523 (1991)].

```

                                10
HIS-LYS-CYS-ASP-ILE-THR-LEU-GLN-GLU-ILE-ILE-LYS-THR-LEU-ASN-
                                20                                30
SER-LEU-THR-GLU-GLN-LYS-THR-LEU-CYS-THR-GLU-LEU-THR-VAL-THR-
                                40
ASP-ILE-PHE-ALA-ALA-SER-LYS-ASN-THR-THR-GLU-LYS-GLU-THR-PHE-
                                50                                60
CYS-ARG-ALA-ALA-THR-VAL-LEU-ARG-GLN-PHE-TYR-SER-HIS-HIS-GLU-
                                70
LYS-ASP-THR-ARG-CYS-LEU-GLY-ALA-THR-ALA-GLN-GLN-PHE-HIS-ARG-
                                80                                90
HIS-LYS-GLN-LEU-ILE-ARG-PHE-LEU-LYS-ARG-LEU-ASP-ARG-ASN-LEU-
                                100
TRP-GLY-LEU-ALA-GLY-LEU-ASN-SER-CYS-PRO-VAL-LYS-GLU-ALA-ASN-
                                110                                120
GLN-SER-THR-LEU-GLU-ASN-PHE-LEU-GLU-ARG-LEU-LYS-THR-ILE-MET-
                                129
ARG-GLU-LYS-TYR-SER-LYS-CYS-SER-SER

```

A diszulfidhidak a 3 és 127, a 24 és 65, valamint a 46 és



99 pozícióban lévő csoportok között vannak. Az IL4 molekulatömege a glikozilezés mértékétől függően változik 15 KDa (nincs glikozilezés) és 60 KDa vagy több (hiperglikozilezett IL4) között.

A humán IL4 DNS-szekvenciáját a korábbiakban már ugyancsak ismertették [Yokota, T. et al., P.N.A.S., 83, 5894-5898 (1986)].

A WO 93/10235. számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentés olyan IL4 mutánsokat ír le, amelyek IL4 antagonisták vagy részleges antagonisták.

A 0 464 533. számú európai szabadalmi bejelentésben olyan fúziós proteineket ismertetnek, amelyek az immunglobulin molekulák konstans szakaszának különféle részeit egy másik humán proteinnel vagy ennek egy részével együtt tartalmazzák.

A jelen találmány egy olyan, IL4 és/vagy IL13 antagonista vagy részleges antagonista aktivitással rendelkező, oldható proteinre vonatkozik, amely egy IL4 mutánst vagy variánst tartalmaz legalább egy humán immunglobulin konstans szakaszhoz vagy ennek egy fragmentumához kapcsolva.

A "mutáns vagy variáns" kifejezés magában foglalja az összes olyan molekulát, például az IL4 protein csonkolt vagy egyéb származékát, amely egy humán betegnek történő internalis beadást követően megtartja az IL4 és/vagy IL13 antagonizáló képességét. Az ilyen "egyéb származékok" az aminosavak addíciójával, deléciójával, szubsztitúciójával vagy átrendezésével, illetve kémiai módosításával állíthatók elő.

Az IL4 mutánsait vagy variánsait kódoló DNS-polimereket az

- 1) 5' CGA ACC ACT GAA TTC CGC ATT GCA GAG ATA 3'
(magában foglal egy EcoRI restrikciós helyet, GAATTC)
- 2) 5' CAC AAA GAT CCT TAG GTA CCG CTC GAA CAC TIT GA 3'
(magában foglal egy KpnI restrikciós helyet, GGTACC)

A primereket 5 ng/μl végkoncentrációban alkalmaztuk, és a 100 μl-es teljes reakciótérfogathoz 0,2 mM végkoncentrációban dNTP-t adtunk. Harmincegy PCR ciklust végeztünk. A ciklusok a következő lépésekből álltak: 94 °C hőmérsékleten 1 percen keresztül végzett denaturációs lépés; 50 °C hőmérsékleten 1 perc 30 másodpercen keresztül végzett temperálási lépés; és 72 °C hőmérsékleten 1 perc 30 másodpercen keresztül végzett elongációs lépés. Az első ciklusban a denaturációs lépés időtartamát 5 percre növeltük, míg az utolsó ciklusban az elongáció idejét hosszabbítottuk meg 7 percre. A PCR reakcióban 2,5 egység Taq polimeráz enzimet (Advanced Biotechnologies) alkalmaztunk. Egy 587bp értékű PCR terméket állítottunk elő. A terméket Promega "Magic PCR cleanup" készlet (kit) alkalmazásával tisztítottuk, majd a "tapadó végek" kialakításához a tisztított terméket a 4. számú reakciópufferben EcoRI és KpnI alkalmazásával emésztettük (a restrikciós enzimeket a Gibco BRL-től szereztük be). A reakciókeveréket 4 óra 30 percen keresztül 37 °C hőmérsékleten melegítettük, majd 10 percen keresztül 70 °C hőmérsékleten tartottuk, ezt követően pedig etanollal precipitáltuk. Az így nyert DNS agaróz-gélelektroforetikus analízise három, hozzávetőleg 570bp, 463bp és 100bp értékű sáv jelenlétét mutatta. Az

570bp értékű fragmentum az IL4 teljes hosszúságú IL4.Y124D variánsnak felel meg, ami a nem tökéletes emésztés eredményeként volt jelen. A két kisebb fragmentum az IL4.Y124D cDNS-ben lévő EcoRI hely eredményeként képződött. Az 570bp értékű sávot Gene-clean™ eljárással megtisztítottuk. Ezt követően az EcoRI és KpnI alkalmazásával végzett emésztéssel előállított, majd a Geneclean™ útján megtisztított terméket Blescript KS⁺™-hez csoltuk, és így egy Bluescript KS⁺/IL4.Y124D rekombinánszt hoztunk létre. Ezt a rekombináns DNS-t nagy mennyiségekben a Promega "Magic Maxiprep" eljárás alkalmazásával állítottuk elő. Az IL4.Y124D inzertet SmaI és KpnI alkalmazásával kimetszettük a Bluescript rekombinánsból. 20 µg rekombináns DNS-t 4. számú reakciópufferben 30 °C hőmérsékleten egy éjszakán keresztül 25 egység SmaI-gyel inkubáltunk. Ezt követően 25 egység KpnI-et adtunk az emésztményhez, amelyet 5 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten inkubáltunk. Az így nyert hozzávetőleg 580bp értékű fragmentumot Geneclean™ eljárással tisztítottuk, amelynek eredményeként egy IL4.Y124D/SmaI/KpnI fragmentumot állítottunk elő.

(b) Az IgG1 kódoló szakasz felépítése

A COSFcLink vektor (1. táblázat) a sarok 1-4 és 6-15, a CH2 1-110 és a CH3 1-108 aminosavait kódoló humán IgG1 cDNS-t tartalmazza [Ellison J., Berson B. and Hood L. E., NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 110, 4071-4079 (1982)]. A sarok 5 csoportját — a nukleotid szekvenciában végzett TGT → GCC módosítás révén — az ismertetett IgG1 szekvenciában lévő ciszteinről alaninra cseréljük. Ezt a humán IgG plazma sejt leukémia ARH-77-ből

(American Type Tissue Collection) RT-PCR alkalmazásával klónoztuk, majd teljes szekventálással bizonyítottuk az ismert szekvenciával (WO 92/00985 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentés) fennálló azonosságát.

A COSFc felépítése egy, a fenti humán IgG1 cDNS-t tartalmazó pUC18 vektorral (pUC18-Fc) kezdődött. KpnI-gyel és SacII-vel végzett emésztéssel törtöltük a CH1-et, a sarokszakaszt és CH2 egy részét. A törölt szakaszt egy, a sarok-CH2 szakaszt tartalmazó, PCR amplifikált fragmentummal helyettesítettük. A következő PCR primereket alkalmaztuk:

5' TCG AGC TCG GTA CCG AGC CCA AAT CGG CCG ACA AAA CTC ACA C 3'

és

5' GTA CTG CTC CTC CCG CGG CTT TGT CTT G 3'

Egy, a sarok-CH2 szakaszt tartalmazó DNS fragmentumot amplifikáltunk a pUC18-Fc-ből, KpnI-gyel és SacII-vel emésztettük, géltisztítottuk, majd KpnI/SacII emésztett pUC18-Fc vektorba klónoztuk. Az IgG1 nehéz láncának a Kabat-féle számozás [Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)] szerinti 230 pozíciójában lévő Cys-t a nukleotid szekvenciában lévő TGT → GCC helyettesítés útján Ala-ra változtattuk. A PCR primerek egyikében lévő megváltoztatott DNS-szekvencia bevezetett egy egyedi KpnI helyet a sarok 5' végénél. A kapott plazmidot pUC18Fcmod névvel láttuk el; a bizonyításhoz a kapcsolódási pontokat és a PCR amplifikált szá-

kaszt szekventáltuk.

A pUC18-Fcmod-ban lévő teljes sarok-CH₂-CH₃ inzertet KpnI és XbaI alkalmazásával egyetlen DNS fragmentumban eltávolítottuk, gél tisztítottuk, majd KpnI és XbaI alkalmazásával kivágva SFcR1Cos4-hez kapcsoltuk, amelynek eredményeként COSFc-t nyertük.

Az SFcR1Cos4 a pST4DHFR [Deen, K., McDougal, J. S., Inacker, R., Folena-Wasserman, G., Arthos, J., Rosenberg, J., Maddon, P. J., Axel, R., and Sweet, R. W., NATURE, 331, 82 (1988)] származéka, amely a cytomegalovirus (CMV) promoter és a bovin-növekedési hormon (BGH) poliadenilezési szakaszai közé inszertálva tartalmazza az oldható I. típusú Fc receptort (sFcR1), valamint magában foglalja még a következőket: a β -globin promoter és az SV40 poliadenilezési szakaszok közé inszertált dihidrofolát reduktáz (DHFR) cDNS; egy SV40 replikációs kezdet; és egy, a baktériumokban történő növekedéshez szükséges, ampicillin-rezisztens gén. A vektort KpnI és XbaI alkalmazásával kivágva eltávolítjuk az sFcR1 kódoló szakaszt, és így a COSFc vektor a CMV promoter és a BGH poliA szakaszok közé inszertálva tartalmazza a sarok-CH₂-CH₃ szakaszt.

A COSFcLink vektort úgy állítottuk elő a COSFc-ből, hogy a vektor egyedi EcoRI helyénél egy oligonukleotid kapcsolót (linkert) inszertáltunk, amely regenerálja ezt az EcoRI helyet és egyidejűleg bevezeti a BstEII, a PstI és az EcoRV klónozó helyeket. Az alkalmazott oligonukleotidok a következők voltak:

5' AATTCGGTTACCTGCAGATATCAAGCT 3'
3' GCCAATGGACGTCTATAGTTCGATTAA 5'

A vektoron belüli orientáció megerősítése érdekében a kapcsolódási pontot szekventáltuk. A végső vektor mérete 6,27 kb volt.

(c) A fúziós proteint kódoló DNS felépítése

Az IL4.Y124D cDNS inszertálásához a COSFcLink vektort EcoRV és KpnI alkalmazásával végzett emésztéssel a következők szerint előállítottuk elő. 5 µg DNS-t 2. számú reakciópufferben 37 °C hőmérsékleten 5 órán keresztül 15 egység EcoRV-vel inkubáltunk, majd etanolos precipitációt végeztünk. Az így nyert DNS-t 4. számú reakciópufferben 37 °C hőmérsékleten 3 órán keresztül KpnI-gyel emésztettük, majd etanolos kicsapást hajtottunk végre. Az IL4.Y124D/SmaI/KpnI és a COSFcLink/EcoRV/KpnI fragmentumokat egymáshoz kapcsolva kialakítottuk a pDB951 plazmidot; a pDB951 plazmid kódolja az IL4.Y124D/IgG1 fúziós proteint. A kapcsolást egy RPN 1507 termékszámú Amersham DNS kapcsolási készlet alkalmazásával hajtottuk végre; a reakciókat egy éjszakan keresztül 16 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A kapcsolási reakciók termékeit nagy hatékonysággal Promega JM109 kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd 50 µg/ml ampicillint tartalmazó Luria Broth agarra helyeztük. A transzformánsokat 50 µg/ml ampicillint tartalmazó Luria Broth-ban tenyésztettük, majd Promega "Magic Minipreps" alkalmazásával DNS-t állítottunk elő. Az IL4.Y124D/COSFcLink rekombináns DNS képződését restriktációs

emésztéssel és DNS szekventálással igazoltuk. A teljes IL4.Y124D szekvenciát és a COSFcLink DNS-sel történő kapcsolódásokat DNS szekventálással támasztottuk alá (2. táblázat). A rekombináns IL4.Y124D/IgG1 DNS kódoló szekvenciája a 3. táblázatban látható, míg a fúziós protein aminosav-szekvenciáját a 4. táblázatban mutatjuk be. Az IL4Y124D/COSFcLink rekombináns DNS-t cézium-klorid gradiens alkalmazásával állítottuk elő és tisztítottuk, majd a DNS-t HeLa sejtek átmeneti transzfektálására alkalmaztuk.

2. A fúziós protein expresszálása

HeLa sejteket növesztettünk 10 % foetalis borjúsérummal és 1 % glutaminnal kiegészített MEM α médiumban (Gibco). A vizsgálat céljára négy nappal a transzfekció előtt 1×10^6 HeLa sejtet oltottunk egy 75 cm²-es lombikban 10 % újszülött borjúsérummal és 1 % glutaminnal kiegészített RPMI-1640 médium ("oltóközeg") 15 ml-ére. A transzfekciót megelőző napon további 12,5 ml oltóközeget adtunk minden egyes lombikhoz. A transzfekció napján, a 0. időpontban a médiumot 15 ml "transzfekciós közeg"-re (10 % újszülött borjúsérumot és 1 % nem-esszenciális aminosavakat tartalmazó MEM médium Earle-sókkal) cseréltük. A +3. óra időpontban 0,125 M kalcium-klorid-oldatban a megfelelő DNS 25 μ g mennyiségét, valamint 1 $\times$ HBS-t (HEPES pufferelt fiziológiás sóoldatot) adtunk a sejtekhez. A +7. óra időpontban a sejteket 15 térfogat%-os glicerinnel kezeltük, majd egy éjszakan keresztül 5 mM nátrium-butirátot tartalmazó oltóközeg 12,5 ml-es mennyiségeiben inkubáltuk. A következő napon a sejteket

PBS-sel (Dulbecco foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldattal) mostuk, majd 12,5 ml-es mennyiségekben "kinyerő közeget" (2 % mennyiségben 7,5 %-os nátrium-hidrogén-karbonát-törzsoldatot tartalmazó RPMI-1640) adtunk a sejtekhez. További 24 órás inkubálás után a felülúszókat eltávolítottuk, a sejttöredékek eltávolítása érdekében 5 percen keresztül 1000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk, majd 4 °C vagy -20 °C hőmérsékleten tároltuk.

3. A biológiai aktivitás

A felülúszó IL4 antagonistáinak aktivitásának vizsgálatát Spits eljárásának [Spits et al., J. IMMUNOLOGY, 139, 1142 (1987)] alkalmazásával végeztük. Az IL4 receptor felülszabályozása érdekében humán perifériás vér lymphocytákat három napon keresztül fitohemagglutininnal, egy T-sejt mitogénnel inkubáltunk. Az így nyert blasztsejteket ezt követően további három napon keresztül IL4-gyel stimuláltuk. A proliferációt a ³H-timidin beépülése útján mértük.

Az IL4.Y124D/IgG1 kiméra a ³H-timidinnek a 133pM IL4-gyel stimulált humán perifériás vér T-lymphocytákba történő beépülését dóziszfüggően gátolta.

2. példa

IL4.Y124D/IgG4 fúziós protein

1. A fúziós proteint kódoló DNS felépítése

Az IL4.Y124D kódoló szakasz amplifikálása érdekében PCR-t

végeztünk, majd a 3' végnél egy XhoI helyet kialakító pontmutációs (silent) nukleotid helyettesítést végeztünk a molekulában. A PCR reakcióhoz szubsztrátként 20 ng linearizált pDB951 plazmidot [1. példa 1. (c)] alkalmaztunk. Az alkalmazott oligonukleotid primerek a következők voltak:

1) 5' CAC AAG TGC GAT ATC ACC TTA CAG GAG ATC 3'

(magában foglal egy EcoRV restrikciós helyet, GATATC)

2) 5' CTC GGT ACC GCT CGA GCA CTT TGA GTC TTT 3'

(magában foglal egy XhoI restrikciós helyet, CTCGAG).

A humán IgG4 nehéz lánc sarok-CH₂-CH₃ fragmentumának amplifikálása érdekében végrehajtottunk egy második PCR reakciót. Ebben az esetben a szubsztrát egy szintetikus humán IgG4 nehéz lánc cDNS volt, amelynek a GB:HUMIGCD2 Genbank szekvencián [Ellison J., Buxbaum J. and Hood L. E., DNA, 1, 11-18 (1981)] alapuló szekvenciáját az 5. táblázatban mutatjuk be. Az ismert nukleotid szekvenciához képest számos pontmutációs (silent) helyettesítést végeztünk. A gén összeállítását két 0,5Kb szintetikus DNS-fragmentum kombinálásával hajtottuk végre. Mindkét 0,5Kb fragmentum előállítását úgy végeztük, hogy átfedő nukleotidok sorozatait hőkezeltük, majd PCR alkalmazásával betöltöttük a térközökbe. A két 0,5Kb fragmentumot a SacII helynél csoltuk és a pCR2 vektorba inszertáltuk. Egy, a teljes konstans szakaszt tartalmazó 0,1Kb ApaI-BglII fragmentumot izoláltunk, majd hozzákapcsoltuk egy olyan, pCD expressziós vektorhoz, amely egy humanizált IL4 specifikus variábilis szakaszt tartal-

mazott. Ezt a szerkezetet alkalmaztuk a PCR szubsztrátjaként az IgG4 sarok-CH2-CH3 szakaszának amplifikálásához.

Az IgG4 sarok-CH2-CH3 szakaszának amplifikálásához a következő oligonukleotid primereket alkalmaztuk:

1) 5' GGT GGA CAA CTC GAG CGA GTC CAA ATA TGG 3'

(magában foglal egy XhoI restrikciós helyet, CTCGAG)

2) 5' TTA CGT AGA TCT AGA CTA CAC TCA TTT ACC 3'

(magában foglal egy XbaI helyet, TCTAGA).

A reakciókörülmények mindkét PCR esetén azonosak a pDB951-nél megadottakkal. A primereket 5 ng/μl koncentrációban, míg a dNTP-t 0,2 mM végső koncentrációban alkalmaztuk 100 μl teljes reakció-térfogatban. A PCR reakcióban 2,5 egység Taq polimeráz enzimet (Advanced Biotechnologies) alkalmaztunk és 31 PCR ciklust hajtottunk végre. A ciklusok a következő lépésekből álltak: 94 °C hőmérsékleten 1 percen keresztül végzett denaturációs lépés; 50 °C hőmérsékleten 1 perc 30 másodpercen keresztül végzett temperálási lépés; és 72 °C hőmérsékleten 1 perc 30 másodpercen keresztül végzett elongációs lépés. Az első ciklusban a denaturációs lépés időtartamát 5 percre növeltük, míg az utolsó ciklusban az elongáció idejét hosszabbítottuk meg 7 percre.

Egy hozzávetőleg 700bp értékű (IgG4 sarok-CH2-CH3) és egy 400bp értékű (IL4.Y124D) PCR terméket állítottunk elő. A termékeket Promega "Magic PCR cleanup" készlet (kit) alkalmazásával tisztítottuk. A "tapadó végek" kialakításához a tisztított ter-

mékeket az IgG4 esetén XhoI és XbaI enzimek, míg az IL4.Y124D esetén EcoRV és XhoI enzimek alkalmazásával emésztettük. A reakciókeveréket 3 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk, ezt követően pedig etanollal precipitáltuk. Az így nyert DNS-ek agaróz-gélelektroforetikus analízise két, hozzávetőleg 690bp értékű (IgG4 sarok-CH2-CH3) és 370bp értékű (IL4.Y124D) sáv jelenlétét mutatta.

Egy olyan vektort állítottunk elő, amelyhez hozzákapcsoltuk az IgG4 sarok-CH2-CH3 és az IL4.Y124D PCR fragmentumokat. A vektort úgy állítottuk elő, hogy az IL4.Y124D/IgG1 fúziós molekula legnagyobb részének eltávolítása érdekében pDB951-et (IL4.Y124D COSFcLink-ben) EcoRV és XbaI enzimekkel emésztettünk. Az egyetlen visszamaradó rész hozzávetőleg 75bp értékű az IL4 5' végénél, amely nincs jelen a PCR amplifikáció által létrehozott IL4.Y124D EcoRV/XhoI fragmentumban. A 2. számú reakciópuffer (GibcoBRL) alkalmazásával 30 µl-es össztérfogatban 5 µg pDB951 DNS-t emésztettünk. Az így nyert 5,8Kb DNS-fragmentumot GeneClean™ alkalmazásával tisztítottuk.

Ezt a három fragmentumot (azaz az IL4.Y124D EcoRV/XhoI, az IgG4 XhoI/XbaI sarok-CH2-CH3 fragmentumot és a pDB951 EcoRV/-XbaI emésztéséből nyert 5,8Kb értékű fragmentumot) egymáshoz kapcsolva kialakítottuk a pDB952 plazmidot; a pDB952 plazmid kódolja az IL4.Y124D/IgG4 fúziós proteint. A kapcsolást egy RPN 1507 termékszámú Amersham DNS kapcsolási készlet alkalmazásával hajtottuk végre; a reakciókat egy éjszakán keresztül 16 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A kapcsolási reakciók termékeit nagy hatékonysággal Promega JM109 kompetens sejtekbe transzformál-

tuk, majd 50 µg/ml ampicillint tartalmazó Luria Broth agarra helyeztük. A transzformánsokat 50 µg/ml ampicillint tartalmazó Luria Broth-ban tenyésztettük, majd Promega "Magic Minipreps" alkalmazásával DNS-t állítottunk elő. Az IL4.Y124D/IgG4 rekombináns DNS képződését restrikciós emésztéssel igazoltuk. A teljes IL4.Y124D és az IgG4 sarok-CH2-CH3 szakaszt DNS szekventálással határoztuk meg. Az IL4.Y124D/IgG4 fúziós molekula kódoló szakaszának szekvenciája a 6. táblázatban látható, míg a fúziós protein aminosav-szekvenciáját a 7. táblázatban mutatjuk be. Az IL4Y124D/IgG4 rekombináns DNS-t cézium-klorid gradiens alkalmazásával állítottuk elő és tisztítottuk, majd a DNS-t HeLa sejtek átmeneti transzfektálására alkalmaztuk.

2. A fúziós protein expresszálása

HeLa sejteket növesztettünk 10 % foetalis borjúsérummal és 1 % glutaminnal kiegészített MEM α médiumban (Gibco). A vizsgálat céljára négy nappal a transzfekció előtt 1×10^6 HeLa sejtet oltottunk egy 75 cm²-es lombikban 10 % újszülött borjúsérummal és 1 % glutaminnal kiegészített RPMI-1640 médium ("oltóközeg") 15 ml-ére. A transzfekciót megelőző napon további 12,5 ml oltóközeget adtunk minden egyes lombikhoz. A transzfekció napján, a 0. időpontban a médiumot 15 ml "transzfekciós közeg"-re (10 % újszülött borjúsérumot és 1 % nem-esszenciális aminosavakat tartalmazó MEM médium Earle-sókkal) cseréltük. A +3. óra időpontban 0,125 M kalcium-klorid-oldatban a megfelelő DNS 25 µg mennyiségét, valamint 1×HBS-t (HEPES puffereelt fiziológiás sóoldatot) adtunk a sejtekhez. A +7. óra időpontban a

sejteket 15 térfogat%-os glicerinnel kezeltük, majd egy éjszakan keresztül 5 mM nátrium-butirátot tartalmazó oltóközeg 12,5 ml-es mennyiségeiben inkubáltuk. A következő napon a sejteket PBS-sel (Dulbecco foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldattal) mostuk, majd 12,5 ml-es mennyiségekben "kinyerő közeget" (2 % mennyiségben 7,5 %-os nátrium-hidrogén-karbonát-törzsoldatot tartalmazó RPMI-1640) adtunk a sejtekhez. További 24 órás inkubálás után a felülúszókat eltávolítottuk, a sejttöredékek eltávolítása érdekében 5 percen keresztül 1000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk, majd 4 °C vagy -20 °C hőmérsékleten tároltuk.

3. A biológiai aktivitás

A felülúszó IL4 antagonistáinak vizsgálatát Spits eljárásának [Spits et al., J. IMMUNOLOGY, 139, 1142 (1987)] alkalmazásával végeztük. Az IL4 receptor felülszabályozása érdekében humán perifériás vér lymphocytákat három napon keresztül fitohemagglutininnal, egy T-sejt mitogénnel inkubáltunk. Az így nyert blasztsejteket ezt követően további három napon keresztül IL4-gyel stimuláltuk. A proliferációt a ³H-timidin beépülése útján mértük.

Az IL4.Y124D/IgG4 kiméra a ³H-timidinnek a 133pM IL4-gyel stimulált humán perifériás vér T-lymphocytákba történő beépülését dóziszfüggően gátolta.

3. példa

IL4.Y124D/IgG4 PE fúziós protein

1. A fúziós proteint kódoló DNS felépítése

Az IL4.Y124D kódoló szakasz amplifikálása érdekében PCR-t végeztünk, majd a 3' végnél egy XhoI helyet kialakító pontmutációs (silent) nukleotid helyettesítést végeztünk a molekulában, annak megfelelően, ahogyan azt a 2. példában ismertettük.

A humán IgG4 nehéz lánc PE variáns sarok-CH₂-CH₃ fragmentumának amplifikálása érdekében végrehajtottunk egy második PCR reakciót. Az IgG4 PE-ben a sarok 10 csoportja (a Kabat-féle számozás szerinti 241 csoport) a vad típusban lévő szerin (S) helyett prolinra (P) van cserélve, míg a a CH₂ 5 csoportja (a Kabat-féle számozás szerinti 248 csoport) a vad típusban lévő leucinről (L) glutamátra (E) van cserélve. Angal és munkatársai egy olyan IgG4 molekulát írtak le, amelyben a Kabat-féle számozás szerinti 241 csoportszerinről prolinra van cserélve [Angal, S., King, D. J., Bodmer, M. W., Turner, A., Lawson, A. D. G., Roberts, G., Pedley, B., and Adair, R., *MOLECULAR IMMUNOLOGY*, 30, 105-108 (1993)]. Ez a csere növeli az IgG4 molekula szérum felezési idejét.

Az IgG4 PE variánst az 5. táblázatban ismertetett szintetikus humán IgG4 nehéz lánc cDNS-ne végzett PCR mutagenézis alkalmazásával hoztuk létre, majd a variánst a pCD expressziós vektorhoz kapcsoltuk. Ezt a plazmidot alkalmaztuk szubsztrátként az IgG4 PE sarok-CH₂-CH₃ fragmentumának amplifikálásához használt PCR reakcióban. Az IgG4 PE variáns szekvenciáját a 8.

táblázatban ismertetjük. Az IgG4 nukleotid szekvencia azon csoportjai, amelyek a PE variáns előállításához meg lettek változtatva, a 8. táblázatnak megfelelően a következők:

a 322 csoport a vad típusban lévő "T"-ről "C"-re lett cserélve a PE variánsban;

a 333 csoport a vad típusban lévő "A"-ról "G"-re lett cserélve a PE variánsban; és

a 343-344 csoportok a vad típusban lévő "CT"-ről "GA"-ra lett cserélve a PE variánsban.

Az IgG4 PE variáns sarok-CH2-CH3 szakasz amplifikációjához ugyanazokat az oligonukleotid primereket alkalmaztuk, mint amelyeket a pDB952 esetén ismertettünk.

Egy hozzávetőleg 700bp értékű (IgG4 PE mutáns sarok-CH2-CH3) és egy 400bp értékű (IL4.Y124D) PCR terméket állítottunk elő. A termékeket Promega "Magic PCR cleanup" készlet (kit) alkalmazásával tisztítottuk. A "tapadó végek" kialakításához a tisztított termékeket az IgG4 PE esetén XhoI és XbaI enzimek, míg az IL4.Y124D esetén EcoRV és XhoI enzimek alkalmazásával emésztettük. A reakciókeveréket 3 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk, ezt követően pedig etanollal precipitáltuk. Az így nyert DNS-ek agaróz-gélelektroforetikus analízise két, hozzávetőleg 690bp értékű (IgG4 PE sarok-CH2-CH3) és 370bp értékű (IL4.Y124D) sáv jelenlétét mutatta.

Az IgG4 PE variáns sarok-CH2-CH3 fragmentum és az IL4.Y124D fragmentum nagyobb mennyiségeinek előállításához a tisztított és emésztett PCR termékeket Bluescript KS⁺™-hez kapcsoljuk, amelyet úgy állítunk elő, hogy az IgG4 PE sarok-CH2-

-CH3 fragmentum esetén XhoI és XbaI enzimekkel, illetve az IL4.Y124D fragmentum esetén EcoRV és XhoI enzimekkel emésztést végzünk, majd Geneclean™ eljárással tisztítást végzünk. Ennek megfelelően egy Bluescript KS⁺/IgG4 PE sarok-CH2-CH3 rekombinánst és egy Bluescript KS⁺/IL4.Y124D rekombinánst hozunk létre. Ezeket a DNS-eket nagy mennyiségekben a Promega "Magic Maxiprep" eljárás alkalmazásával állítjuk elő. Az IgG4 PE sarok-CH2-CH3 fragmentumot XhoI és XbaI alkalmazásával kivágjuk a Bluescript rekombinánsból. Az így nyert hozzávetőleg 690bp értékű fragmentumot Geneclean™ eljárással tisztítva nagy mennyiségben nyerjük az IgG4 PE sarok-CH2-CH3 XhoI/XbaI fragmentumot. Az IL4.Y124D fragmentumot EcoRV és XhoI enzim alkalmazásával kivágjuk a Bluescript rekombinánsból. Az így nyert hozzávetőleg 370bp értékű fragmentumot Geneclean™ eljárással tisztítjuk.

Egy olyan vektort állítottunk elő, amelyhez hozzákapcsoltuk az IgG4 PE sarok-CH2-CH3 és az IL4.Y124D fragmentumokat. A vektort úgy állítjuk elő, hogy pDB951-t EcoRV és XbaI enzimekkel emésztünk, annak megfelelően ahogyan azt a pDB952 esetén ismertettük.

A három fragmentumot (azaz az IL4.Y124D EcoRV/XhoI, az IgG4 PE variáns XhoI/XbaI sarok-CH2-CH3 fragmentumot és a pDB951 EcoRV/XbaI emésztéséből nyert 5,8Kb értékű fragmentumot) egymáshoz kapcsolva kialakítottuk a pDB953 plazmidot. A kapcsolást egy RPN 1507 termékszámú Amersham DNS kapcsolási készlet alkalmazásával hajtottuk végre; a reakciókat egy éjszakán keresztül 16 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A kapcsolási reakciók termékeit nagy hatékonysággal Promega JM109 kompetens sejtekbe

transzformáltuk, majd 50 µg/ml ampicillint tartalmazó Luria Broth agarra helyeztük. A transzformánsokat 50 µg/ml ampicillint tartalmazó Luria Broth-ban tenyésztettük, majd Promega "Magic Minipreps" alkalmazásával DNS-t állítottunk elő. Az IL4.Y124D/IgG4 PE variáns rekombináns DNS képződését restrikciós emésztéssel igazoltuk. A teljes IL4.Y124D és az IgG4 PE variáns sarok-CH2-CH3 szakaszt DNS szekventálással határoztuk meg. Az IL4.Y124D/IgG4 PE fúziós molekula kódoló szakaszának szekvenciája a 9. táblázatban látható, míg a fúziós protein aminosav-szekvenciáját a 10. táblázatban mutatjuk be. Az IL4Y124D/IgG4 PE rekombináns DNS-t cézium-klorid gradiens alkalmazásával állítottuk elő és tisztítottuk, majd a DNS-t HeLa sejtek átmeneti transzfektálására alkalmaztuk.

2. A fúziós protein expresszálása

HeLa sejteket növesztettünk 10 % foetalis borjúsérummal és 1 % glutaminnal kiegészített MEM α médiumban (Gibco). A vizsgálat céljára négy nappal a transzfekció előtt 1×10^6 HeLa sejtet oltottunk egy 75 cm²-es lombikban 10 % újszülött borjúsérummal és 1 % glutaminnal kiegészített RPMI-1640 médium ("oltóközeg") 15 ml-ére. A transzfekciót megelőző napon további 12,5 ml oltóközeget adtunk minden egyes lombikhoz. A transzfekció napján, a 0. időpontban a médiumot 15 ml "transzfekciós közeg"-re (10 % újszülött borjúsérumot és 1 % nem-esszenciális aminosavakat tartalmazó MEM médium Earle-sókkal) cseréltük. A +3. óra időpontban 0,125 M kalcium-klorid-oldatban a megfelelő DNS 25 µg mennyiségét, valamint 1×HBS-t (HEPES pufferelt fizio-

lógias sóoldatot) adtunk a sejtekhez. A +7. óra időpontban a sejteket 15 térfogat%-os glicerinnel kezeltük, majd egy éjszakan keresztül 5 mM nátrium-butirátot tartalmazó oltóközeg 12,5 ml-es mennyiségeiben inkubáltuk. A következő napon a sejteket PBS-sel (Dulbecco foszfát-pufferelt fiziológias sóoldattal) mostuk, majd 12,5 ml-es mennyiségekben "kinyerő közeget" (2 % mennyiségben 7,5 %-os nátrium-hidrogén-karbonát-törzsoldatot tartalmazó RPMI-1640) adtunk a sejtekhez. További 24 órás inkubálás után a felülúszókat eltávolítottuk, a sejttöredékek eltávolítása érdekében 5 percen keresztül 1000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk, majd 4 °C vagy -20 °C hőmérsékleten tároltuk.

3. A biológiai aktivitás

A felülúszó IL4 antagonistá aktivitásának vizsgálatát Spits eljárásának [Spits et al., J. IMMUNOLOGY, 139, 1142 (1987)] alkalmazásával végeztük. Az IL4 receptor felülszabályozása érdekében humán perifériás vér lymphocytákat három napon keresztül fitohemagglutininnal, egy T-sejt mitogénnel inkubáltunk. Az így nyert blasztsejteket ezt követően további három napon keresztül IL4-gyel stimuláltuk. A proliferációt a ³H-timidin beépülése útján mértük.

Az IL4.Y124D/IgG4 PE kiméra a ³H-timidinnek a 133pM IL4-gyel stimulált humán perifériás vér T-lymphocytákba történő beépülését dóziszfüggően gátolta.

4. példa

**IL4.Y124D/IgG4 PE fúziós proteint kódoló DNS-t tartalmazó emlős
expressziós vektor****1. A DNS felépítése**

A pCDN vektor [Aiyar, N., Baker, E., Wu, H.-L., Nambi, P., Edwards, R. M., Trill, J. J., Ellis, C., Bergsma, D., MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY, 131, 75-86 (1994)] a következőket tartalmazza: a CMV promoter, egy polilinker klónozó szakasz, valamint a BGH poliadenilező szakasz. A vektor az előbbieken kívül a következőket foglalja magában: egy, a β -globin promoter és az SV40 poliadenilezési szakasz közé inszertált bakteriális neomycin foszforotranszferáz gén (NEO) a Geneticin™ szelekcióhoz; a β -globin promoter és a BGH poliadenilezési szakasz közé inszertált DHFR szelekciós kazetta a methotrexate (MTX) amplifikációhoz; egy ampicillin-rezisztens gén a baktériumokban történő tenyésztéshez; és egy SV40 replikációs kezdet.

Az IL4.Y124D/IgG4 PE cDNS inszertálásához a pCDN vektort NdeI és BstXI alkalmazásával végzett emésztéssel a következők szerint előállítottuk elő. 15 μ g DNS-t 2. számú reakciópufferben (Gibco-BRL) 55 °C hőmérsékleten egy órán keresztül 30 egység BstXI enzimmal inkubáltunk, majd etanolos precipitációt végeztünk. Az így nyert DNS-t 2. számú reakciópufferben 37 °C hőmérsékleten egy órán keresztül NdeI enzimmal emésztettük, majd etanolos kicsapást hajtottunk végre. Az IL4.Y124D/IgG4 PE fragmentumot pDB953-ból (3. példa 1.) BstXI és NdeI enzimekkel végzett emésztéssel a következők szerint állítottuk elő. 15 μ g

DNS-t 2. számú reakciópufferben 55 °C hőmérsékleten egy órán keresztül 30 egység BstX1 enzimmal inkubáltunk, majd etanolos precipitációt végeztünk. Az így nyert DNS-t 2. számú reakciópufferben 37 °C hőmérsékleten egy órán keresztül NdeI enzimmal emésztettük, majd etanolos kicsapást hajtottunk végre.

Az IL4.Y124D/IgG4 PE NdeI/BstX1 és a pCDN NdeI/BstX1 fragmentumokat egymáshoz kapcsolva kialakítottuk a pCDN-IL4.Y124D/-IgG4 PE plazmidot. A kapcsolást 2 egység T4 DNA Ligase (Gibco BRL) és T4 DNA Ligase puffer alkalmazásával végre; a reakciókat egy éjszakán keresztül 16 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A kapcsolási reakciók termékeit szubklónozási hatékonysággal Gibco-BRL DH5a kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd 75 µg/ml ampicillint tartalmazó Luria Broth agarra helyeztük. A transzfórmánsokat 50 µg/ml ampicillint tartalmazó Luria Broth-ban tenyésztettük, majd lúgos lizálással DNS-t állítottunk elő. Az IL4.Y124D/IgG4 PE DNS képződését restriktációs emésztéssel igazoltuk. A rekombináns IL4.Y124D/IgG4 PE DNS teljes szekvenciáját szekventálással támasztottuk alá. A pCDN-IL4.Y124D/IgG4 PE rekombináns DNS-t Qiagen oszlopok alkalmazásával állítottuk elő és tisztítottuk, majd a DNS-t COS-sejtek átmeneti infekciójára alkalmaztuk és a stabil klónok kialakításához elektroporetikus úton CHO sejtekbe juttattuk.

2. A fúziós protein expresszálása

a) Tranziens expresszálás COS-sejtekben

COS-1 sejteket növesztettünk 10 % foetalis borjúsérummal kiegészített DMEM médiumban. A transzfekcióhoz 24 órával koráb-



ban 2×10^5 sejtet oltottunk egy 35 mm-es szövettenyésztő edényre. 6 μ l LIPOFECTAMINE Reagent (Gibco-BRL) 100 μ l szérummentes DMEM-mel készített oldatához hozzáadtuk 1 μ g DNS 100 μ l szérummentes DMEM-mel készített oldatát, a keveréket óvatosan összekevertük, majd 45 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A sejteket szérummentes DMEM-mel egyszer mostuk. A DNS-LIPOFECTAMINE oldathoz hozzáadtunk 0,8 ml szérummentes DMEM-et, a keveréket óvatosan összekevertük, majd a meghígított oldatot a sejtek fölé rétegeztük. A sejteket 5 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk, majd 20 % foetalis borjúsérumot tartalmazó DMEM 1 ml-ét adtuk a sejtekhez. Az expresszió mértékének meghatározásához 48-72 órával később vizsgáltuk a sejteket.

b) Elektroporáció CHO-sejtekbe

ACC-098 CHO-sejteket {DG-44 CHO-ból származó szuszpenziós sejtvonal [Urlaub, G., Kas, E., Carothers, A. M., and Chasin, L. A., CELL, 33, 405-412 (1983)]} a WO 92/05246. számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentésben ismertetett, szérummentes tenyésztőközegben növesztettünk. A palzmid linearizálása érdekében 15 μ g pCDN-IL4.Y124D/IgG4 PE plazmidot 30 egység NotI enzimmal 37 °C hőmérsékleten 3 órán keresztül emésztettünk, majd etanollal kicsapást végeztünk. Az így nyert DNS-t egyszer 50 μ l TE-ben (10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA) szuszpendáltuk. A DNS-t egy Bio Rad Gene Pulser készülék (380 V és 25 μ Fd) alkalmazásával 1×10^7 ACC-098 sejtbe elektroporáltuk. A sejteket $2,5 \times 10^4$ sejt/ml koncentrációban szuszpendáltuk a tenyésztőkö-

zegben, majd 200 μ l sejtszuszpenziót helyeztünk egy 96-lyukú lemez minden egyes lyukába. A médiumot 48 órával később 400 μ g/ml G418 (Geneticin) tartalmú tenyésztőközegre cseréltük. A szelekció után 21 nappal a telepeken képződött kondicionált médiumot Elisa-vizsgálattal szkríneltük. A sokszorozás érdekében a legnagyobb expresszáló telepeket 24-lyukú lemezekre vittük át.



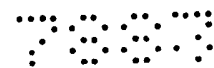
1. táblázat: A COSFeLink vektor DNS-szekvenciája, 6367bp

1. számú szekvencia SEQ ID No:1

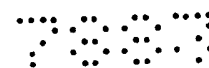
GACGTCGACGGATCGGGAGATCGGGGATCGATCCGTCGACGTACGACTAGTTATTAATAG	60
TAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTT	120
ACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATG	180
ACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTAT	240
TTACGGTAAACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCT	300
ATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGG	360
GACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG	420
TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTC	480
CACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCAAAA	540
TGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC	600
TATATAAGCAGAGCTGGGTACGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCGAATTCGG	660
TTACCTGCAGATATCAAGCTAATTCGGTACCGAGCCCAAATCGGCCGACAAAACCTCACAC	720
ATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC	780
AAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGA	840
CGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA	900
TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGT	960
CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA	1020
CAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA	1080
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCT	1140
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG	1200
GCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT	1260
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG	1320
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC	1380
GGGTAAATGAGTGTAGTCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCA	1440
GCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC	1500
TGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATCTAT	1560
TCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA	1620
TGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCAGCTGGGGCTCGAGGGGGGATCTCCCGATC	1680
CCCAGCTTTGCTTCTCAATTTCTTATTTGCATAATGAGAAAAAAGGAAAATTAATTTTA	1740
ACACCAATTCAGTAGTTGATTGAGCAAATGCGTTGCCAAAAGGATGCTTTAGAGACAGT	1800
GTTCTCTGCACAGATAAGGACAAACATTATTTCAGAGGGAGTACCCAGAGCTGAGACTCCT	1860
AAGCCAGTGAGTGGCACAGCATTCTAGGGAGAAATATGCTTGTCATCACCGAAGCCTGAT	1920
TCCGTAGAGCCACACCTTGGTAAGGGCCAATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGGAG	1980
CCAGGGCAGAGCATATAAGGTGAGGTAGGATCAGTTGCTCCTCACATTTGCTTCTGACAT	2040



AGTTGTGTTGGGAGCTTGGATAGCTTGGACAGCTCAGGGCTGCGATTTTCGCGCCAAACTT 2100
GACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATCCCCGCTGCCATCATGGTTTCGAC 2160
CATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAATATGGGGATTGGCAAGAACGGAGACCTAC 2220
CCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACCACAACCTCTTCAG 2280
TGGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTCTCCATTCTTGAGA 2340
AGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCAC 2400
CACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGACTTATTGAACAAC 2460
CGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGTTCTGTTTACCAGG 2520
AAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTTAGACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAATTTG 2580
AAAGTGACACGTTTTTCCAGAAATTGATTTGGGGAAATATAAACTTCTCCAGAATACC 2640
CAGGCGTCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTACG 2700
AGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAGTTCTCTGCTCCCCCTCCTAAAGCTATGCA 2760
TTTTTATAAGACCATGCTAGCTTGAACCTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAA 2820
AGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGT 2880
TTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCAACGATAGCTTATCTGTGGGC 2940
GATGCCAAGCACCTGGATGCTGTTGGTTTCTGCTACTGATTTAGAAGCCATTTGCCCCC 3000
TGAGTGGGGCTTGGGAGCACTAACTTTCTCTTTCAAAGGAAGCAATGCAGAAAGAAAAGC 3060
ATACAAAGTATAAGCTGCCATGTAATAATGGAAGAAGATAAGGTTGTATGAATTAGATTT 3120
ACATACTTCTGAATTGAACTAAACACCTTTAAATTCTTAAATATATAACACATTTTCATA 3180
TGAAAGTATTTTACATAAGTAACTCAGATACATAGAAAACAAAGCTAATGATAGGTGTCC 3240
CTAAAAGTTCATTTATTAATTCTACAAATGATGAGCTGGCCATCAAATTCAGCTCAAT 3300
TCTTCAACGAATTAGAAAGAGCAATCTGCAAACCTCATCTGGAATAACAAAAACCTAGGA 3360
TAGCAAAAACCTCTTCTCAAGGATAAAAGAACCTCTGGTGGAAATCACCATGCCTGACCTAA 3420
AGCTGTACTACAGAGCAATTGTGATAAAAACCTGCATGGTACTGATATAGAAACGGACAAG 3480
TAGACCAATGGAATAGAACCCACACACCTATGGTCACTTGATCTTCAACAAGAGAGCTAA 3540
AACCATCCACTGGAAAAAAGACAGCATTTTCAACAAATGGTGCTGGCACAACCTGGTGGTT 3600
ATCATGGAGAAGAATGTGAATTGATCCATTCCAATCTCCTTGTAAGGTCAAATCTAA 3660
GTGGATCAAGGAACTCCACATAAAACCAGAGACACTGAAACTTATAGAGGAGAAAGTGGG 3720
GAAAAGCCTCGAAGATATGGGCACAGGGGAAAAATTCTGAATAGAACAGCAATGGCTTG 3780
TGCTGTAAGATCGAGAATTGACAAATGGGACCTCATGAAACTCCAAAGCTATCGGATCAA 3840
TTCTTCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCGGCCTCGG 3900
CCTCTGCATAAATAAAAAAAATTAGTCAGCCATGCATGGGGCGGAGAATGGGCGGAACTG 3960
GGCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTAATTG 4020
AGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGGTT 4080
GCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTT 4140
CCACACCCTAACTGACACACATTCCACAGAATTAATTCCCGATCCCGTCGACCTCGAGAG 4200
CTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCC 4260
ACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTA 4320
ACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCA 4380



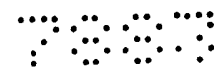
GCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTC 4440
CGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGC 4500
TCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACAT 4560
GTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTT 4620
CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCG 4680
AAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTC 4740
TCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGT 4800
GGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAA 4860
GCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTA 4920
TCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAA 4980
CAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAA 5040
CTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTT 5100
CGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTT 5160
TTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGAT 5220
CTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAT 5280
GAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATC 5340
AATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC 5400
ACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTA 5460
GATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGA 5520
CCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCG 5580
CAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGC 5640
TAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCAT 5700
CGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTC CCAACGATCAAG 5760
GCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGAT 5820
CGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAA 5880
TTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAA 5940
GTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGA 6000
TAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATTCATTGGAAAACGTTCTTCGGG 6060
GCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGC 6120
ACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGG 6180
AAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACT 6240
CTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACAT 6300
ATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGT 6360
GCCACCT 6367



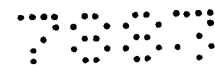
2. táblázat: A COSFcLink vektorban lévő, az Y124D-IgG1 fúziós
molekulát kódoló DNS-szekvencia, 6926bp

2. számú szekvencia

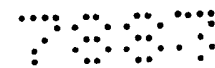
GACGTCGACGGATCGGGGAGATCGGGGATCGATCCGTCGACGTACGACTAGTTATTAATAG	60
TAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTT	120
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATG	180
ACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTAT	240
TTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCT	300
ATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGG	360
GACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG	420
TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTC	480
CACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAA	540
TGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC	600
TATATAAGCAGAGCTGGGTACGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCGAATTTCGG	660
TTACCTGCAGATGGGCTGCAGGAATTCCGCATTGCAGAGATAATTGTATTTAAGTGCCTA	720
GCTCGATAACAATAAACGCCATTTGACCATTACACCATTTGGTGTGCACCTCCAAGCTTAC	780
CTGCCATGGGTCTCACCTCCCAACTGCTTCCCCCTCTGTTCTTCCTGCTAGCATGTGCCG	840
GCAACTTTGTCCACGGACACAAGTGGATATCACCTTACAGGAGATCATCAAACTTTGA	900
ACAGCCTCACAGAGCAGAAGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGACATCTTTGCTG	960
CCTCCAAGAACACAACCTGAGAAGGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCCGGCAGT	1020
TCTACAGCCACCATGAGAAGGACACTCGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCACA	1080
GGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTTGAAACGGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGG	1140
GCTTGAATTCTGTCTGTGAAGGAAGCCAACCAGAGTACGTTGGAAAACCTTCTTGAAA	1200
GGCTAAAGACGATCATGAGAGAGAAAGACTCAAAGTGTTTCGAGCGGTACCGAGCCCAAAT	1260
CGGCCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT	1320
CAGTCTTCTCTTCCCCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG	1380
TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG	1440
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA	1500
CGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT	1560
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG	1620
CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA	1680
CCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG	1740
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG	1800
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC	1860
AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA	1920
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGTAGTCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGA	1980



CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCC 2040
TGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTC 2100
TGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATT 2160
GGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCAGCTGGGGCTC 2220
GAGGGGGGATCTCCCGATCCCAGCTTTGCTTCTCAATTTCTTATTTGCATAATGAGAAA 2280
AAAAGGAAAATTAATTTTAACACCAATTTCAGTAGTTGATTGAGCAAATGCGTTGCCAAA 2340
AGGATGCTTTAGAGACAGTGTTCTCTGCACAGATAAGGACAAACATTATTCAGAGGGAGT 2400
ACCCAGAGCTGAGACTCCTAAGCCAGTGAGTGGCACAGCATTCTAGGGAGAAATATGCTT 2460
GTCATCACCGAAGCCTGATTCCGTAGAGCCACACCTTGGAAGGGCCAATCTGCTCACAC 2520
AGGATAGAGAGGGCAGGAGCCAGGGCAGAGCATATAAGGTGAGGTAGGATCAGTTGCTCC 2580
TCACATTTGCTTCTGACATAGTTGTGTTGGGAGCTTGGATAGCTTGGACAGCTCAGGGCT 2640
GCGATTTGCGGCCAACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATCCCC 2700
GCTGCCATCATGGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAATATGGGGATT 2760
GGCAAGAACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGA 2820
ATGACCACAACCTCTTCAGTGGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACC 2880
TGGTTCTCCATTTCCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGT 2940
AGAGAACTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCC 3000
TTAAGACTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGA 3060
GGCAGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTTAGACTCTTTGTGACA 3120
AGGATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCCAGAAATTGATTTGGGGAAATAT 3180
AAACTTCTCCCAGAATACCCAGGCGTCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAG 3240
TATAAGTTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAGTTCTCTGCT 3300
CCCCCTCTAAAGCTATGCATTTTTTATAAGACCATGCTAGCTTGAACCTGTTTATTGCAGC 3360
TTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTC 3420
ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCAA 3480
CGATAGCTTATCTGTGGGCGATGCCAAGCACCTGGATGCTGTTGGTTTCCTGCTACTGAT 3540
TTAGAAGCCATTTGCCCCCTGAGTGGGGCTTGGGAGCACTAACTTCTCTTCAAAGGAA 3600
GCAATGCAGAAAGAAAAGCATACAAAGTATAAGCTGCCATGTAATAATGGAAGAAGATAA 3660
GGTTGTATGAATTAGATTTACATACTTCTGAATTGAACTAAACACCTTTAAATTCTTAA 3720
ATATATAACACATTTTCATATGAAAGTATTTTACATAAGTAACTCAGATACATAGAAAACA 3780
AAGCTAATGATAGGTGTCCCTAAAAGTTCATTTATTAATTCTACAAATGATGAGCTGGCC 3840
ATCAAAATTCAGCTCAATTCTTCAACGAATTAGAAAGAGCAATCTGCAAACCTCATCTGG 3900
AATAACAAAAAACCTAGGATAGCAAAAACCTCTTCTCAAGGATAAAAGAACCTCTGGTGGA 3960
ATCACCATGCCTGACCTAAAGCTGTACTACAGAGCAATTGTGATAAAAACCTGCATGGTAC 4020
TGATATAGAAACGGACAAGTAGACCAATGGAATAGAACCCACACACCTATGGTCACTTGA 4080
TCTTCAACAAGAGAGCTAAAACCATCCACTGGAAAAAAGACAGCATTTTCAACAAATGGT 4140
GCTGGCACAACCTGGTGGTTATCATGGAGAAGAATGTGAATTGATCCATTCCAATCTCCTT 4200
GTACTAAGGTCAAATCTAAGTGGATCAAGGAACTCCACATAAAACCAGAGACACTGAAAC 4260
TTATAGAGGAGAAAGTGGGGAAAAGCCTCGAAGATATGGGCACAGGGGAAAAATTCCTGA 4320



ATAGAACAGCAATGGCTTGTGCTGTAAGATCGAGAATTGACAAATGGGACCTCATGAAAC 4380
TCCAAAGCTATCGGATCAATTCTCCAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCA 4440
GAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAATTAGTCAGCCATGCATGGGG 4500
CGGAGAATGGGCGGAAC TGGGCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGAC 4560
TATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGG 4620
GGACTTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGC 4680
TGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTAACTGACACACATTCCACAGAATTAATTCCCG 4740
ATCCCGTCGACCTCGAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATT 4800
GTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG 4860
GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGT 4920
CGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTT 4980
TGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGC 5040
TGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGG 5100
ATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGG 5160
CCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGAC 5220
GCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTG 5280
GAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCT 5340
TTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGG 5400
TGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCCGACCGCT 5460
GCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCAC 5520
TGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGT 5580
TCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTC 5640
TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA 5700
CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGAT 5760
CTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTAC 5820
GTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATT 5880
AAAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACC 5940
AATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTG 6000
CCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTG 6060
CTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGC 6120
CAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA 6180
TTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTG 6240
TTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACAGCT 6300
CCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTA 6360
GCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGG 6420
TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGA 6480
CTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT 6540
GCCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCA 6600
TTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT 6660



CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTT	6720
CTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA	6780
AATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATT	6840
GTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCG	6900
GCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCT	6926

3. táblázat: Az IL4.Y124D/IgG1 fúziós molekulát kódoló szakasz

DNS-szekvenciája, 1164bp

3. számú szekvencia

ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCTTCCCCCTCTGTTCTTCCTGCTAGCATGTGCCGGCAAC	60
TTTGTCCACGGACACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGATCATCAAACTTTGAACAGC	120
CTCACAGAGCAGAAGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGACATCTTTGCTGCCTCC	180
AAGAACACAACCTGAGAAGGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCCGGCAGTTCTAC	240
AGCCACCATGAGAAGGACACTCGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCACAGGCAC	300
AAGCAGCTGATCCGATTCTGAAACGGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGCTTG	360
AATTCCTGTCCTGTGAAGGAAGCCAACCAGAGTACGTTGGAAAACCTTCTTGGAAGGCTA	420
AAGACGATCATGAGAGAGAAAGACTCAAAGTGTTTCGAGCGGTACCGAGCCCAAATCGGCC	480
GACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC	540
TTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA	600
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC	660
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC	720
CGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG	780
TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA	840
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAG	900
AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG	960
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC	1020
GACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG	1080
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC	1140
CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	1164



4. táblázat: A kódolt IL4.Y124D/IgG1 fúziós protein
szekvenciája, 387aa

4. számú szekvencia

1 MGLTSQLLPP LFFLLACAGN FVHGHKCDIT LQEIIKTLNS LTEQKTLCTE
51 LTVTDIFAAS KNTTEKETFC RAATVLRQFY SHHEKDTRCL GATAQQFHRH
101 KQLIRFLKRL DRNLWGLAGL NSCPVKEANQ STLENFLERL KTIMREKDSK
151 CSSGTEPKSA DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT
201 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
251 QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK
301 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
351 TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK*

5. táblázat: A szintetikus IgG4 cDNS DNS-szekvenciája, 1006bp

5. számú szekvencia

GCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAG	60
AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACC GG TGACGGTGTCG	120
TGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA	180
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACC	240
TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCC	300
AAATATGGTCCCCCATGCCATCATGCCAGCACCTGAATTTCTGGGGGGACCATCAGTC	360
TTCTGTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACG	420
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGAT	480
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTAC	540
CGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAG	600
TGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCATCGATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA	660
GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAG	720
AACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAG	780
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC	840
GACGGATCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGG	900
AATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGC	960
CTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGAGTGTAGTCTAGATCTACGTATG	1006

6. táblázat: Az IL4.Y124D/IgG4 fúziós proteint kódoló szakasz
DNS-szekvenciája, 1149bp

6. számú szekvencia

ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCTTCCCCCTCTGTTCTTCCTGCTAGCATGTGCCGGCAAC	60
TTTGTCCACGGACACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGATCATCAAACTTTGAACAGC	120
CTCACAGAGCAGAAGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGACATCTTTGCTGCCTCC	180
AAGAACACAACCTGAGAAGGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCCGGCAGTTCTAC	240
AGCCACCATGAGAAGGACACTCGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCACAGGCAC	300
AAGCAGCTGATCCGATTCTGAAACGGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGCTTG	360
AATTCCTGTCTGTGAAGGAAGCCAACCAGAGTACGTTGGAAAACCTTCTTGAAAGGCTA	420
AAGACGATCATGAGAGAGAAAGACTCAAAGTGCTCGAGCGAGTCCAAATATGGTCCCCCA	480
TGCCCCATCATGCCCAGCACCTGAATTTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTCCCCCA	540
AAACCCAAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGAC	600
GTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT	660
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC	720
CTCACCGTCTTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC	780
AAAGGCCTCCCGTCATCGATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAG	840
CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG	900
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG	960
CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGATCCTTCTTC	1020
CTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGC	1080
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTG	1140
GGTAAATGA	1149



7. táblázat: A kódolt IL4.Y124D/IgG4 fúziós protein
szekvenciája, 382aa

7. számú szekvencia

1 MGLTSQLLPP LFFLLACAGN FVHGHKCDIT LQEIIKTLNS LTEQKTLCTE
51 LTVTDIFAAS KNTTEKETFC RAATVLRQFY SHHEKDTRCL GATAQQFHRH
101 KQLIRFLKRL DRNLWGLAGL NSCPVKEANQ STLENFLERL KTIMREKDSK
151 CSSESKYGPP CPSCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
201 VSQEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRWSV LTVLHQDVVLN
251 GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL
301 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS
351 RWQEGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSL GK*

8. táblázat: Az IgG4 PE variáns DNS-szekvenciája, 984bp

8. számú szekvencia

GCTAGTACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAG	60
AGCACgGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG	120
TGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCA	180
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACC	240
TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCC	300
AAATATGGTCCCCCATGCCCAcCATGCCCAGCgCCTGAaTTtgaGGGGGGACCATCAGTC	360
TTCCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACG	420
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGAT	480
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTAC	540
CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAG	600
TGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCATCGATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA	660
GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAG	720
AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAG	780
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC	840
GACGGaTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGG	900
AATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGC	960
CTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA	984

9. táblázat: Az IL4.Y124D/IgG4 PE fúziós molekulát kódoló
szakasz DNS-szekvenciája, 1149bp

9. számú szekvencia

ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCTTCCCCCTCTGTTCTTCTGCTAGCATGTGCCGGCAAC	60
TTTGTCCACGGACACAAGTGCATATCACCTTACAGGAGATCATCAAACTTTGAACAGC	120
CTCACAGAGCAGAAGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGACATCTTTGCTGCCTCC	180
AAGAACAACACTGAGAAGGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCCGGCAGTTCTAC	240
AGCCACCATGAGAAGGACACTCGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCACAGGCAC	300
AAGCAGCTGATCCGATTCCTGAAACGGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGCTTG	360
AATTCTGTCTGTGAAGGAAGCCAACCAGAGTACGTTGGAAACTTCTTGGAAAGGCTA	420
AAGACGATCATGAGAGAGAAAGACTCAAAGTGCTCGAGCGAGTCCAAATATGGTCCCCCA	480
TGCCCCACCATGCCCAGCGCTGAATTTGAGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCA	540
AAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGAC	600
GTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT	660
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC	720
CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC	780
AAAGGCCTCCCGTCATCGATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAG	840
CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG	900
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG	960
CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGA TCCTTCTTC	1020
CTCTACAGCAGGCTAACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGC	1080
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTG	1140
GGTAAATGA	1199

10. táblázat: A kódolt IL4.Y124D/IgG4 PE variáns fúziós protein
szekvenciája, 382aa

10. számú szekvencia

1	MGLTSQLLPP	LFFLLACAGN	FVHGKCDIT	LQEIIKTLNS	LTEQKTLCTE
51	LTVTDIFAAS	KNTTEKETFC	RAATVLRQFY	SHHEKDTRCL	GATAQQFHRH
101	KQLIRFLKRL	DRNLWGLAGL	NSCPVKEANQ	STLENFLERL	KTIMREKDSK
151	CSSESKYGPP	CPPCPAPEFE	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD
201	VSQEDPEVQF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	FNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN
251	GKEYKCKVSN	KGLPSSIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSQ	EEMTKNQVSL
301	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTTP	PVLDSGDSFF	LYSRLTVDKS
351	RWQEGNVFSC	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSL	GK*	

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy IL4 és/vagy IL13 antagonistá vagy részleges antagonistá aktivitással rendelkező oldható protein, amely legalább egy humán immunglobulin konstans szakaszhoz vagy ennek fragmentumához kapcsolva egy IL4 mutánst vagy variánst tartalmaz.

2. Egy 1. igénypont szerinti vegyület, amelyben legalább egy, a vad típusú IL4 120-128 pozícióinak bármelyikében természetesen előforduló aminosavat egy eltérő természetes aminosav helyettesít.

3. Egy 2. igénypont szerinti vegyület, amelyben a 124 pozícióban természetesen előforduló tirozint egy eltérő természetes aminosav helyettesíti.

4. Egy 3. igénypont szerinti vegyület, amelyben a 124 pozícióban természetesen előforduló tirozint aszparaginsav helyettesíti.

5. Egy, az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben az immunglobulin az IgG alosztályba tartozik.

6. Egy 5. igénypont szerinti vegyület, amelyben a konstans szakasz vagy ennek fragmentuma a humán IgG nehéz lánc konstans szakasz egésze vagy lényeges része.

7. Egy 5. igénypont szerinti vegyület, amelyben a konstans szakasz vagy ennek fragmentuma a humán IgG4 nehéz lánc konstans szakasz egésze vagy lényeges része.

8. Egy 1. igénypont szerinti vegyület, amely a 4. számú szekvenciának, a 7. számú szekvenciának vagy a 10. számú szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciával rendelkezik.

9. Eljárás egy, az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti vegyület előállítására, **azzal jellemezve**, hogy a vegyületet kódoló DNS-t egy rekombináns gazdasejtben expresszáljuk, majd a terméket kinyerjük.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy

- i) olyan replikálható expressziós vektort állítunk elő, amely egy gazdasejtben alkalmas egy, a vegyületet kódoló nukleotid szekvenciát tartalmazó DNS-polimer expresszálására;
- ii) a vektorral egy gazdasejtet transzformálunk;
- iii) a vegyület termelése érdekében a transzformált gazdasejtet olyan körülmények között tenyésztjük, amelyek lehetővé teszik a DNS-polimer expresszióját; és
- iv) kinyerjük a vegyületet.

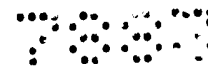
11. DNS polimer, amely egy, az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet kódoló nukleotid szekvenciát tartalmaz.

12. Egy 11. igénypont szerinti DNS polimer, amely a 3. számú szekvenciát, a 6. számú szekvenciát vagy a 9. számú szekvenciát tartalmazza, illetve a 3. számú szekvenciából, a 6. számú szekvenciából vagy a 9. számú szekvenciából áll.

13. Replikálható expressziós vektor, amely egy 11. igénypont szerinti DNS polimert tartalmaz.

14. Egy 13. igénypont szerinti replikálható expressziós vektorral transzformált gazdasejt.

15. Gyógyszerkészítmény, **azzal jellemezve**, hogy egy, az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet és egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozót tartalmaz.



16. Egy, az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti vegyület felhasználása az IL4 és/vagy az IL13 nemkívánatos hatásaiból származó állapotok kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására.

A meghatalmazott:


Derssi Katalin
Szakdolgozó, gyógyszerész
az SOTK és K. Nemzeti
Szakdolgozóiroda tagja
1146 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

Földvári