



H U 0 0 0 2 1 5 9 0 9 B

(19) Országkód

**HU****MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG****MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL****SZABADALMI  
LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**215 909 B**

(21) A bejelentés ügyszáma: P 92 02075  
(22) A bejelentés napja: 1990. 12. 18.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
07/453,931 1989. 12. 20. US  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 90/07288  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 91/09127

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

**C 12 N 15/38**  
C 07 K 14/05  
A 61 K 38/16  
C 12 N 15/63

(40) A közzététel napja: 1994. 05. 30.  
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1999. 03. 29.

(72) Feltalálók:

Kastelein, Robert A., Redwood City, Kalifornia  
(US)  
Moore, Kevin W., Palo Alto, Kalifornia (US)

(73) Szabadalmaz:

Schering Corp., Kenilworth, New Jersey (US)

(74) Képvisező:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi  
Iroda, Budapest

(54) **Eljárás gamma-interferon inhibitor hatású rekombináns BCRF1-fehérjék,  
és ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására**

## KIVONAT

A találmány gamma-interferon szintézisét gátló BCRF1-fehérjék rekombináns úton történő előállítására és az erre szolgáló rekombináns expressziós vektorok előállítására vonatkozik.

A találmány tárgyát képezi továbbá a fenti rekombináns BCRF1-fehérjéket tartalmazó gyógyszerkészít-

mények előállítása, melyek túlzott gamma-interferon-termeléssel és nem megfelelő immunválasszal társult betegségek kezelésére szolgálnak.

A találmány gamma-interferon inhibitor hatású BCRF1 Epstein-Barr (EBV) -vírusproteinek rekombináns úton történő előállítására vonatkozik. A találmány tárgyát képezi továbbá a BCRF1-fehérjéket tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítása, amelyek elsősorban a túlzott gamma-interferon-termeléssel és nem megfelelő immunválasszal társult betegségek kezelésére szolgálnak.

Az immunrendszer az egymásra erős kölcsönhatást kifejtő szövetek, sejtípusok és szolubilis faktorok bonyolult összessége. Legutóbb felvetették, hogy számos betegség és immunológiai rendellenesség összefüggésben lehet az immunrendszer bizonyos összetevői, főként a citokinek között fennálló egyensúlyhiánnyal [(lásd például: Mosmann et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 7, 145–173 (1989); Cher et al., *J. Immunol.*, 138, 3688–3694 (1987); Mosmann et al., *Immunol. Today*, 8, 223–227 (1987); Heinzel et al., *J. Exp. Med.*, 169, 59–72 (1989)].

Nagyszámú bizonyíték van arra, hogy például a gamma-interferon (IFN- $\gamma$ ) túlzott termelése felelős a fő hisztokompatibilitási komplexszel (MHC=major histocompatibility complex) összefüggő autoimmun betegségekért: Hooks et al., *New England J. Med.*, 301, 5–8 (1979) (az IFN- $\gamma$  emelkedett szérumszintje kapcsolatban van az autoimmunitással); Basham et al., *J. Immunol.*, 130, 1492–1494 (1983) (az IFN- $\gamma$  növelheti MHC-géntermék kifejeződését); Battazzo et al., *Lancet*, 1115–1119 (11/12/83) (az abnormális MHC-géntermék kifejeződés kapcsolatban van az autoimmunitás bizonyos formáival); Hooks et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 301, 21–32 (1980) (SLE-betegekben a betegség súlyosabb volta összefügg a magasabb IFN- $\gamma$  szintekkel, és az interferon hisztaminkibocsátást fokozó hatását meg lehet gátolni antiinterferonszérumokkal); Jacob et al., *J. Exp. Med.*, 166, 798–803 (1987) (szisztémás lupus erythematosus (SLE) egérmockelkben a betegség különböző állapotaival járó rohamokat enyhíti, és késlelteti az anti-IFN- $\gamma$  monoklonális antitestekkel való blokkolást); és Iwatani et al., *J. Clin. Endocrin. and Metabol.*, 63, 695–708 (1986) (az anti-IFN- $\gamma$ ) monoklonális antitest megszünteti a leukoagglutinin-stimulált T-sejtek HLA-DR expressziót indukáló képességét). Feltételezik, hogy az IFN- $\gamma$  feleslege okozza az MHC-géntermék nem megfelelő kifejeződését, amely azután autoimmun reakciókat vált ki olyan szövetek ellen, amelyeknek a sejtjei nem megfelelően fejezik ki az MHC-termékeket, és mint autoantigének lépnek fel a termékekkel összefüggésben. Ezért McDevit [*Clin. Res.*, 34, 163–175 (1985)] feltételezte, hogy autoimmun betegségekben az IFN- $\gamma$ -szintek csökkentése például IFN- $\gamma$ -antagonisták adásával, jótékony hatással járhat.

A fenti megállapításokon kívül az IFN- $\gamma$ -nak az allergiában is szerepe lehet azáltal, hogy monocitákon az Fc $\epsilon$ -receptorok számát és sűrűségét képes növelni; szerepe van a sarcoidosis és psoriasis patogenezisében; valószínűleg növeli a sejt közvetítette immunitást, amely fő szerepet játszik az idegen szövetrel transzplantált betegek szövetkilökődésében.

A fentiek alapján rendkívül előnyös lenne, ha az IFN- $\gamma$ -szintek csökkentésére alkalmas vegyületek állnának rendelkezésre olyan betegségek kezelésére, amelyek összefüggenek a nem megfelelő immunválasszokkal, ilyenek például bizonyos parazitás megbetegedések, allergia és az MHC-vel összefüggő immunológiai rendellenességek, beleértve a következőket: reumatoid arthritis, szisztémás lupus erythematosus (SLE), vészes izomgyengeség (myasthenia gravis), inzulinfüggő diabetes mellitus, thyroiditis stb.

Meglepő módon azt találtuk, hogy a találmány szerint előállított BCRF1-fehérjék gátolják a gamma-interferon túltermelődését, és ennek alapján alkalmasak a nagymértékű IFN- $\gamma$ -termeléssel összefüggő betegségek kezelésére.

A találmány részben azon a felismerésen alapul, hogy egy nemrég felfedezett proteint, a citokinszintézis-gátló faktort (cytokine synthesis inhibitory factor=CISF), kódoló nukleinsavszekeveencia nagyfokú homológiát mutat az EBV BCRF1 nyílt leolvasási keretével. Az EBV egy humán herpeszvírus, amely minden humánpopulációban endémiás, és számos betegséggel társul [lásd például Dillner et al., *Adv. Cancer Res.*, 50, 95–158 (1988); Thorley-Lawson, *Biochim. Biophys. Acta*, 948, 263–286 (1988); és Tasato, *Adv. Cancer Res.*, 49, 75–125 (1987)]. Az EBV körülbelül 172 kb méretű kettős szálú DNS-genommal rendelkezik [Bear et al., *Nature*, 310, 207–211 (1984)]. A genom több nyílt leolvasási keretet tartalmaz, melyek nyilvánvalóan az EBV által termelt fehérjéknek felelnek meg (EP-A 0173254). Hudson és munkatársai [*Virology* 147, 81–98 (1985)] meghatározták az EBV-genomban a BCRF1 nyílt leolvasási keretét (lásd 2. számú szekvenencia), amely egy 170 aminosavból álló fehérjét kódol (lásd 1. számú szekvenencia), amelyben a szignálszekvenenciát 14 aminosavból állónak javasolták. Ezzel szemben azt találtuk, hogy a szignálszekvenencia 23 aminosavat tartalmaz, és az érett BCRF1-fehérje 147 aminosavból áll (lásd 3. számú szekvenencia).

A fentiek alapján a találmány tárgyát képezi egy rekombináns eljárás, amely a BCRF1 nyílt leolvasási kerete érett polipeptidjeinek és fehérjeinek előállítására szolgál. Az eljárás abban áll, hogy

(i) megszerkesztünk egy rekombináns expressziós vektort oly módon, hogy egy érett BCRF1-fehérjét kódoló DNS-szekvenenciát működőképesen beépítünk egy alkalmas expressziós vektorba,

(ii) egy gazdasejtet transzfektálunk vagy transzformálunk az így kapott rekombináns expressziós vektorral,

(iii) az említett gazdasejtet tenyésztjük a kívánt fehérje expresszióját biztosító körülmények között, és

(iv) az expresszált BCRF1-fehérjét izoláljuk.

A találmány tárgyát képezi még a rekombináns BCRF1 termelésére szolgáló expressziós vektorok előállítása, melynek során egy érett BCRF1-fehérjét kódoló DNS-szekvenenciát működőképesen beépítünk egy alkalmas expressziós vektorba. Előnyösen az 1. vagy 3. számú szekvenenciában megadott aminosavszekeveenciával rendelkező fehérjét kódoló DNS-szekvenenciát építjük

be. Expressziós vektorként előnyösen egy bakteriális vagy egy emlős expressziós vektort használunk.

A találmány továbbá a rekombináns BCRF1-fehérjét tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására is vonatkozik, amelyek a gamma-interferon-túltermeléssel és nem megfelelő immunválasszal társult betegségek kezelésére szolgálnak, amely abban áll, hogy egy találmány szerint előállított BCRF1-fehérje hatásos mennyiségét valamilyen gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval és/vagy segédanyaggal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítjuk. A találmány szerinti gyógyszerkészítményekben használt BCRF1-et előnyösen az 1. számú szekvenciában megadott aminosavszekvencia által meghatározott nyílt leolvasási keret szerinti érett polipeptid és fehérjék csoportjából választjuk ki. Az 1. számú szekvenciában a rövidítések az aminosav L-formáira vonatkoznak, és az aminosavakat az N-terminális végétől kezdve soroljuk fel. Legelőnyösebben a 3. számú szekvencia által meghatározott aminosavszekvenciával rendelkező BCRF1-fehérjét alkalmazzuk.

Az alábbiakban az ábrák rövid leírása következik.

Az 1. ábrán egy BCRF1 termelésére használt emlős expressziós vektor vázlatos rajzát mutatjuk be.

A 2. ábrán egy BCRF1 termelésére használt bakteriális expressziós vektor vázlatos rajzát mutatjuk be.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmányt.

A találmány tárgyát képezi a BCRF1 nyílt leolvasási kerete érett polipeptidjeinek vagy fehérjeinek előállítása. A szekretált fehérjék esetében a nyílt leolvasási keret rendszerint olyan polipeptidet kódol, amely érett vagy szekretált termékből áll, és ez N-terminális végénél kovalens kötéssel kapcsolódik egy szignálpeptidhez. A szignálpeptid az érett vagy aktív polipeptid szekretálása előtt lehasad. A hasítási hely, tapasztalati szabályok alapján, nagyfokú pontossággal meghatározható [lásd például von Heijne, *Nucleic Acids Research*, 14, 4683–4690 (1986)], és úgy tűnik, hogy a szignálpeptid pontos aminosav-összetétele nem lényeges funkciója szempontjából [lásd például Randall et al., *Science*, 243, 1156–1159 (1989)]; [Kaiser et al., *Science*, 235, 312–317 (1987)]. Ebből következik, hogy az érett proteinek könnyen kifejezhetjük olyan vektorokkal is, amelyek egészen más szignálpeptideket kódolnak, mint amelyet az 1. számú szekvencia által meghatározott nyílt leolvasási keret kódol.

Az expressziós rendszerek (azaz gazda-expressziós vektor kombinációk) széles változatát használhatjuk a találmány szerinti proteinek előállítására. A gazdasejtek lehetséges típusai közé tartoznak – nem kizárólagosan – a bakteriális, élesztő-, rovar-, emlős- stb. sejtek. Számos közlemény áll rendelkezésre, amelyek útmutatást adnak a specifikus expressziós rendszerek kiválasztásához és/vagy ezek módosításához. Például (hogy néhányat említsünk): de Boer és Shepard, „Strategies for Optimizing Foreign Gene Expression in *Escherichia coli*”, Kroon (szerk.) *Genes: Structure and Expression*, John Wiley and Sons, 205–247 old. New York (1983), több *E. coli* expressziós rendszer áttekintése; Kucheralapati et al., *Critical Reviews in Biochemistry*, 16, (4.

kiadás) 349–379 old. (1984) és Banerji et al., *Genetic Engineering*, 5, 19–31 (1983) emlőssejtek transzfek-tálására és transzformálására szolgáló módszerek ismer-tetése; Reznikoff és Gold (szerk.) *Maximizing Gene Expression* (Butterworths, Boston, 1986) *E. coli*, élesztő- és emlőssejtekben való génkifejeződésről szóló vá-logatott közlemények áttekintése; és Thilly, *Mamma-lian Cell Technology* (Butterworths, Boston, 1986) em-lős expressziós rendszerek ismertetése. Fentiekhez ha-sonlóan több olyan összefoglaló közlemény áll rendelkezésre, amelyek a specifikus cDNS-ek összekapcsolá-sára és/vagy manipulálására használt technikákat és fel-tételeket írják le, valamint olyan expressziót szabályozó szekvenciákat ismertetnek, amelyek a találmányban való felhasználásra alkalmas expressziós vektorok ké-sztéséhez és/vagy módosításához használhatók [Pél-dául: Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Labora-tory Manual*, 2. kiadás, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. (1989)].

20 Riggs a 4,431,739 számú amerikai egyesült álla-mokbeli szabadalmi leírásban egy *E. coli* expressziós rendszert ismertetett. Az említett szabadalmi leírást ez a találmány referenciaként tartalmazza. Az *E. coli*-ban való magas szintű kifejeződéshez különösen alkalmas prokarióta promoterek közé tartozik a *tac*-promoter, melyet de Boer ismertetett a 4,551,433 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, mely itt referenciaként szerepel, és a Remaut és munkatársai [*Gene*, 15, 81–93 (1981)] által leírt pL-promoter, mely itt ugyancsak referenciaként szerepel. Szekréciós expressziós vektorok szintén rendelkezésre állnak *E. coli* gazdasejtek számára. Különösen hasznosak a pIN–III–ompA vektorok – ezeket Ghayreb és munkatársai [*EMBO J.*, 3, 2437–2442 (1984)] ismertették – amelyekben az átírandó cDNS-t fuzionálták az ompA-protein szignálpeptidjét kódoló *E. coli* ompA-gén ré-széhez, melynek következményeként az érett protein a baktérium periplazmatikus térben szekretálódik. A 4,336,336, 4,411,994, 4,332,892 és 4,338,397 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások prokariótákhoz alkalmas szekréciós expressziós vektorokat írnak le. Ezek az utalások a találmányban referen-ciaként szerepelnek. Számos baktérium alkalmas gaz-dasejt a prokarióta expressziós vektorok számára. Ilye-nek a következő *E. coli* törzsek: W3110 (ATCC 27325 sz.), JA221, C600, ED767, DH1, LE392, HB101, X1776 (ATCC 31244 sz.), X2282, RR1 (ATCC 31343 sz.), MRC1; továbbá a *Bacillus subtilis* törzsek; és más enterobacteriaceae fajok, mint a *Salmo-nella typhimurium* vagy a *Serratia marcescens* és a kü-lönböző *Pseudomonas* fajok. Olyan baktériumtörzsek előállításához, mint az eukariótaproteinek expresszió-jára alkalmas *E. coli* K12 X1776, általános módszereket ismertet Curtis a 4,190,495 számú amerikai egyesült ál-lamokbeli szabadalmi leírásban. Ennek megfelelően ezt a szabadalmi leírást itt referenciaként használjuk fel. A prokarióta- és eukariótamikroorganizmusokon kívül többsejtű szervezetekből származó sejteket tartalmazó expressziós rendszerek is használhatók a találmány sze-rinti proteinek előállítására. Különösen előnyösek az

emlős expressziós rendszerek, mivel sokkal valószínűbb, hogy ezek poszttranszlációs feldolgozómechanizmusa emlősproteineket termel.

Számos DNS-tumorvírust használtak vektorként emlős gazdasejtekhez. Különösen fontosak azok a vektorok, amelyek SV40 replikációs, transzkripció és/vagy transzlációs szabályozószekvenciákat tartalmaznak bakteriális replikációs szabályozószekvenciával összekapcsolva. Ilyenek például az Okayama és Berg [Mol. Cell. Biol., 2, 161–170 (1982) és Mol. Cell. Biol., 3, 280–289 (1983)] által kifejlesztett és Takebe és munkatársai [Mol. Cell. Biol., 8, 466–472 (1988)] által tökéletesített pcD-vektorok. Az említett közleményeket referenciaként használjuk. További SV40-en alapuló emlős expressziós vektorok például az adenovírus szabályozóelemeket tartalmazó vektorok [Kaufman és Sharp, Mol. Cell. Biol., 2, 1304–1319 (1982) és Clark et al., 4,675,285 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás]. A szakirodalmi hivatkozás és az említett szabadalmi leírás itt referenciaként szerepel. Rendszerint a majomsejtek az előnyben részesített gazdasejtek a fenti vektorok számára. Ezek a vektorok, amelyek SV40 ori-szekvenciákat és egy és A gént tartalmaznak, autonóm módon képesek replikálódni majomsejtekben (így nagyobb másolatszámot és/vagy stabilabb másolatszámot adnak, mint a nem autonóm módon replikálódó plazmidok). Ezenkívül azok a vektorok, amelyek az SV40 ori-szekvenciákat és A gén nélkül tartalmazzák, szintén autonóm módon replikálódnak magas (de nem stabil) másolatszámú COS7 majomsejtekben. Ezeket a vektorokat, melyek az ATCC intézménytől beszerezhetők CRL 1651 letéti számon, Gluzman [Cell, 23, 175–182 (1981)] ismertette. Fenti SV40-alapú vektorok más emlőssejtek – ilyenek az egér L-sejtek – transzformálására is képesek azáltal, hogy a gazdasejt DNS-ébe integrálódnak.

A találmány szerint előállított BCRF<sub>1</sub> biológiai aktivitása egyszerűen meghatározható IFN- $\gamma$ -gátlási vizsgálatokkal. Ezekhez a vizsgálatokhoz IFN- $\gamma$ -t szintetizáló sejtvonal vagy sejtpopuláció szükséges. A perifériás vérlimfociták (PBL=peripheral blood lymphocyte), amelyeket egy mitogénnel, például fitohemagglutininnel (PHA=phytohemagglutinin) stimuláltak, alkalmas sejtpopulációként jöhetnek számításba. A vizsgálatot nagyvonalakban a következőképpen végezzük: a PHA-val stimulált PBL-eket két egyenlő részre osztjuk. Az egyik részhez hozzáadjuk a BCRF<sub>1</sub>-tartalmú mintát. A másik kész kontrollként szolgál. Több nap múlva mindkét tenyészet felülűszoját IFN- $\gamma$ -tartalomra vizsgáljuk. Ezt a vizsgálatot alkalmas módon standard ELISA-módszerrel végezzük, melyben kereskedelembe kapható (például: Genzyme Inc., Boston, MA., USA) monoklonális és poliklonális IFN- $\gamma$  elleni antitesteket használunk. A vizsgálat eredményét az átitrt IFN- $\gamma$  mRNS-mennyisége is kifejezheti, mely például RNS-blotting segítségével, PCR-rel (PCR=polymerase chain reaction) vagy hasonló módszerrel mérhető. Perifériás vérlimfocitákat standard módszerekkel nyerhetünk [lásd például: Mishell et al., (szerk.) Selected Methods in Cellular Immunology, Freeman, New York (1980)].

Ha a találmány szerinti polipeptidek oldható formában fejeződnek ki, például transzformált élesztő- vagy emlőssejtek szekretált termékeiként, úgy ezeket a szakma standard eljárásaival tisztíthatjuk. Az eljárások a következő lépésekből állnak: ammónium-szulfátos kicsapás, ioncserélő kromatográfia és/vagy ehhez hasonló módszerek. [Lásd például: Enzyme Purification and Related Techniques, Methods in Enzymology, 22, 233–577 (1977) és Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982); a hivatkozott irodalom útmutatást ad ilyen tisztítási eljárásokhoz]. Ha a találmány szerinti polipeptidek oldhatatlan formában – például mint aggregátumok, zárványtestek vagy hasonlóak – fejeződnek ki, ezek a szakma standard eljárásaival ugyancsak tisztíthatók: a zárványtesteket centrifugálással választjuk el az elroncsolt gazdasejtektől, s a zárványtesteket kaotróp szerekkel vagy redukálószerrel szolubilizáljuk, majd a kaotróp szerek és redukálószer koncentrációját úgy csökkentjük, hogy a polipeptid felvegye biológiailag aktív konformációját. Ez utóbbi eljárásokat a következő közlemények és szabadalmi leírások tartalmazzák: Winkler et al., Biochemistry, 25, 4041–4045 (1986); Winkler et al., Biotechnology, 3, 992–998 (1985); Koths et al., 4,569,790 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; és EP A20215625 és EP A20212960 számú európai közzétételi irat. Az említett leírásokat referenciaként használjuk fel.

A „hatásos mennyiség” kifejezés a leírásban egy olyan mennyiséget jelent, amely elégségesen enyhíti az INF- $\gamma$  feleslege által közvetített betegség egy kórtünetét. Adott betegnél a hatásos mennyiség a következő tényezőktől függően változhat: a kezelendő betegség fokozatától, a beteg általános egészségi állapotától, a beadás módjától, a mellékhatások súlyosságától stb. A BCRF<sub>1</sub>-et tartalmazó találmány szerinti gyógyszerkészítményt úgy állítjuk elő, hogy BCRF<sub>1</sub> hatásos mennyiségét és egy, a gyógyszergyártásban szokásos hordozót vagy kötőanyagot összekeverünk és gyógyszerkészítménnyé alakítunk. Gyógyszerészeti hordozó lehet bármilyen kompatibilis, nem toxikus anyag, amely alkalmas arra, hogy a találmány szerinti készítményt betegnél alkalmazzuk. Az ilyen gyógyszerek parenterális beviteléhez használt összetételek általában jól ismertek [például: Remington's Pharmaceutical Science, 15. kiadás, Mack Publishing Company, Easton, PA., (1980)]. A találmány szerinti készítmények egyébként gyógyszerkibocsátó rendszer formájában is beültethetők a betegbe. Például: Urquhart et al., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 24, 199–236 (1984); Lewis (szerk.) Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals, Plenum Press, New York (1981); 3,773,919 számú, 3,270,960 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás.

Ha parenterálisan alkalmazzuk a BCRF<sub>1</sub>-et, akkor egy adagos injekció formában (például: oldat, szuszpenzió vagy emulzió) formulázzuk, gyógyszerészeti hordozóval együtt. Az ilyen hordozók önmagukban nem toxikusak és nem gyógyhatásúak. Ilyen hordozó például a normál (izotóniás) konyhasóoldat, a Ringer-oldat, glükózoldat és a Hank-oldat. Nemvízes hordozó-

kat is használhatunk, ilyenek az állandó olajok és az etil-oleát. Előnyös hordozó az 5%-os glükóz/konyhasó oldat. A hordozó kis mennyiségben adalékanyagokat is tartalmazhat, ilyenek az izotonicitást és a kémiai stabilitást fokozó anyagok, például a pufferek és konzerválószerke. A BCRF<sub>1</sub>-et előnyösen tisztított formában, lényegében aggregátumoktól és más proteinektől mentesen formulázunk, körülbelül 5–20 µg/ml közötti koncentrációban. A BCRF<sub>1</sub>-et előnyösen folyamatos infúzióban alkalmazzuk olyan módon, hogy naponta 1–10 mg/testtömeg-kg, előnyösen 50–800 µg-nyi mennyiségét (körülbelül 1–16 µg/kg/nap) adjuk be. A napi infundálás ütemezése a mellékhatások, vérsajt-szám stb. megfigyelése alapján változtatható.

Az alábbiakban példák következnek, melyek nem korlátozzák a találmány oltalmi körét.

### 1. példa

BCRF<sub>1</sub> kifejezése COS7-majomsejtekben.

A BCRF<sub>1</sub> nyílt leolvasási keretét meghatározó gént polimeráz láncreakcióval (PCR) sokszorozzuk, olyan primerek használatával, amelyek lehetővé teszik, hogy a sokszorozott fragmentumot később EcoRI-gyel emésztett pcD(SRα) -vektorba (1. ábra) építsük be. A beépített fragmentum kódolószálat a 2. számú szekvencia ábrázolja.

A megfelelő irányítottágú inszertumot tartalmazó klónokat a BCRF<sub>1</sub> expressziója révén és/vagy restriktions emésztések elektroforetikus képe alapján azonosítottuk. Egy ilyen vektor, mely a BCRF<sub>1</sub>-gént hordozza, pBCRF1(SRα) elnevezést kapott, és letétbe helyeztük az ATCC intézménynél 68193 letéti számon 1989. 12. 20-án. A pBCRF1(SRα)-t E. coli MC1061-sejtekben sokszoroztuk, standard technikákkal izoláltuk, és COS7-majomsejtek transzformációjára használtuk a következőképpen: a transzfecció előtt egy nappal körülbelül  $1,5 \times 10^6$  COS7-majomsejtet oltunk le egyedi 100 mm-es lemezekre, Dulbecco által módosított 5% fetális borjúszérumot (FCS) és 2 mM glutamint tartalmazó Eagle táptalajra (DME). A COS-sejteket – a transzfecció véghezviteléhez – tripszinnel való inkubálással távolítjuk el a lemezekről, kétszer mossuk szérumentes DME-ben és szérumentes DME-ben szuszpendáljuk  $10^7$  sejt/ml sűrűségben. A szuszpenzió 0,75 ml aliquot részéhez 20 µg DNS-t keverünk, és az elektroporációhoz átviszük egy steril, 0,4 cm-es küvettába. A sejteket 10 perc múlva 200 V, 960 µF mellett pulzáljuk BioRad-féle Gene Pulser készülékben. Újabb 10 perc múlva a sejteket eltávolítjuk a küvettából, és bevisszük 20 ml 5% FCS, 2 mM glutamin-, penicillin-, streptomycin- és gentamicintartalmú DME-be. Az elegyet négy egyenlő részben négy 100 mm-es szövettényesztő csészére visszük. A csészéket 12–24 órán át 37 °C-on 5% széndioxid mellett tartjuk, majd a táptalajt hasonló, csak 1% FCS-t tartalmazó táptalajra cseréljük, és az inkubálást tovább folytatjuk 72 órán át 37 °C-on, 5% széndioxid mellett. Ezt követően a táptalajt összegyűjtjük, és arra vizsgáljuk, hogy képes-e gátolni az IFN-γ szintézisét.

Frissen izolált perifériás vér limfocitáit tartalmazó szuszpenzió (körülbelül  $2 \times 10^6$  sejt/ml) 10 ml-eit 37 °C-

on PHA-val (100 µg/ml) inkubáljuk olyan táptalajban, melynek 90%-a 5% FCS-sel és 2 mM glutaminnal kiegészített DME-ből és 10%-a az előzőleg pBCRF<sub>1</sub> (SRα)-val transzfecciózott COS7-sejtek felülcszórából áll.

- 5 A sejteket és a felülcszórákat 24 óra múlva összegyűjtjük, és akár IFN-α mRNS, akár INF-γ-protein jelenlétére vizsgáljuk. A kontrollokat azonos módon kezeljük, kivéve, hogy a 10% felülcszórázó olyan COS7-tenyésztésről származik, amelyet előzőleg egy nem rokon cDNS-inszertumot hordozó plazmiddal transzfeccióztunk. A BCRF<sub>1</sub>-gyel kezelt minták az IFN-γ-szintézisre körülbelül 50%-os gátlást fejtettek ki a kontrollhoz képest.

### 2. példa

- 15 Érett BCRF<sub>1</sub> kifejezése Escherichia coli sejtekben.

A 3. számú szekvencia által meghatározott aminosavszekvenciával rendelkező, érett BCRF<sub>1</sub>-et kódoló gént kifejeztük E. coliban.

- A pBCRF1(SRα) cDNS-inszertumát M13-plazmidba klónoztuk, amikor is kétszer módosítottuk helyre irányuló mutagenézissel: először egy ClaI-helyet képeztünk az érett BCRF<sub>1</sub>-polipeptidet kódoló szakasz 5'-végén, és másodszor egy BamHI-helyet képeztünk az érett BCRF<sub>1</sub>-polipeptidet kódoló szakasz 3'-végén.
- 25 A mutagenizált szekvenciát ezután egyszerűen beépítettük az alább leírt TRPC11 expressziós vektorba.

- A TRPC11-vektort úgy szerkesztjük, hogy egy szintetikus, általánosan elfogadott RBS-fragmentumot (RBS=ribosome binding site) ClaI-linkerekhez (ATGCAT) ligálunk, majd a kapott fragmentumokat A ClaI-gyel hasított pMT11hc-plazmidba (melyet előzőleg úgy módosítottunk, hogy ClaI-helyet tartalmazzon) klónozzuk be. A pMT11hc a pBR322-plazmid egy kisméretű (2, 3 kilobázis méretű), magas másolatszámú AMP<sup>R</sup>, TET<sup>S</sup> származéka, amely a πVX-plazmid EcoRI–HindIII polilinker szakaszait hordozza [a πVX leírását lásd: Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)]. Ezt a plazmidot módosítottuk olyan módon, hogy ClaI-helyet tartalmazzon. Úgy járunk el, hogy a pMT11hc-t EcoRI-gyel és BamHI-gyel hasítjuk, a kapott 5' ragadós végeket betöltjük, és ClaI-linkerrel (CATCGATG) ligáljuk, miáltal visszaállítjuk az EcoRI- és BamHI-helyeket, és a SmaI-helyet ClaI-hellyel cseréljük ki. A TRP11-szerkezet egy transzformált egyede tandem RBS-szekvenciát tartalmazott, melyet ClaI-helyek határoltak. Az egyik ClaI-helyet és az RBS-szekvencia második másolatának egy részét olyan módon távolítjuk el, hogy e plazmidot PstI-gyel emésztjük, Bal31-nukleázal kezeljük, EcoRI-gyel hasítjuk és T4 DNS-polimerázzal kezeljük a négy dezoxinukleotid-trifoszfát jelenlétében. A kapott 30–40 bp méretű fragmentumokat PAGE (poliakrilamid-gél-elektroforézis) segítségével izoláljuk, és beklónozzuk a SmaI-gyel hasított pUC12-be. A pKC101-ből [Nichols et al., Methods in Enzymology, 101, 155 oldal. Academic Press, N. Y. (1983)] származó 248 bp méretű E. coli trpP-t hordozó EcoRI-fragmentumot ezután beklónozzuk az EcoRI-helyre, hogy teljessé tegyük a
- 60 TRPC11 szerkezetét, melyet a 2. ábrán mutatunk be. A

TRPC11-et használjuk a BCRF<sub>1</sub> vektora gyanánt úgy, hogy először ClaI-gyel és BamHI-gyel emésztjük, tisztítjuk, majd összehozzuk az érett BCRF<sub>1</sub>-et kódoló nukleotidszekvenciát tartalmazó M13 ClaI–BamHI fragmentumával, standard ligálóoldatban. Az inszertumot tartalmazó TRPC11-et – elnevezése TRPC11–BCRF<sub>1</sub> – E. coli K12 JM101 törzsben – hozzáférhető az ATCC intézménynél 33876 letéti szám alatt – szaporítjuk el.

A feltalálók a pBCRF<sub>1</sub> (SR $\alpha$ ) -plazmidot hordozó E. coli MC1061 törzset az ATCC intézményben (American Type Culture Collection, Rockville, MD., USA) 68193 letéti számon helyezték letétbe. A letétbe helyezés 1989. december 20-án történt, az ATCC „Szabadal-

mi Célokot Szolgáltató Letétek”-re (Culture Deposit for Patent Purposes) vonatkozó megállapodásban kikötött feltételek mellett. A letétbe helyezés megfelel a „Budapesti Egyezmény a Mikroorganizmusok Letétbe helyezéséről” előírásainak.

#### Szekvencialista

A szekvencia azonosítási száma: 1

A szekvencia jellege: aminosav

A szekvencia hossza: 170 aminosavmaradék

A szekvencia szálltípusa: egyszálú

Topológia: lineáris

A molekula jellege: protein/polipeptid

Eredeti forrásszervezet: Epstein–Barr-vírus

Tulajdonságok: BCRF<sub>1</sub>

Az 1. számú szekvencia leírása:

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

A szekvencia azonosítási száma: 2

A szekvencia jellege: nukleotid

A szekvencia hossza: 513 bázis

A szekvencia szálltípusa: egyszálú

Topológia: lineáris

A molekula jellege: DNS-szekvencia

Eredeti forrásszervezet: Epstein–Barr-vírus

Tulajdonságok: BCRF<sub>1</sub>



## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás egy BCRF1-fehérje előállítására, amely képes a túlzott gamma-interferon-termelés gátlására, *azzal jellemezve, hogy*

(i) megszerkesztünk egy rekombináns expressziós vektort oly módon, hogy egy érett BCRF1-fehérjét kódoló DNS-szekvenciát működőképesen beépítünk egy alkalmas expressziós vektorba,

(ii) egy gazdasejtet transzfektálunk vagy transzformálunk az így kapott rekombináns expressziós vektorral,

(iii) az említett gazdasejtet tenyésztjük a kívánt peptid expresszióját biztosító körülmények között, és

(iv) az expresszált BCRF1-fehérjét izoláljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy a 3. számú szekvencia által meghatározott aminosavszekvenciával rendelkező BCRF1-fehérjét állítjuk elő.*

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás (i) lépése, *azzal jellemezve, hogy a megszerkesztett rekombináns expressziós vektor az American Type Culture Collection letéteményes szervnél ATCC 68 193 számon letétbe helyezett pBCRF1 (SR $\alpha$ ) vektor.*

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás (ii) lépése, *azzal jellemezve, hogy gazdasejtként bakteriális sejtet alkalmazunk.*

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás (ii) lépése, *azzal jellemezve, hogy gazdasejtként emlőssejtet alkalmazunk.*

6. Eljárás rekombináns expressziós vektor előállítására, *azzal jellemezve, hogy egy érett BCRF1-fehérjét kódoló DNS-szekvenciát működőképesen beépítünk egy alkalmas expressziós vektorba.*

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy a 3. számú szekvenciában megadott aminosavszekvenciával rendelkező BCRF1-fehérjét kódoló DNS-szekvenciát építjük be.*

8. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy az American Type Culture Collectionnál ATCC*

68 193 számon deponált BCRF1 (SR $\alpha$ ) rekombináns expressziós vektort állítjuk elő.

9. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy a TRPC11-BCRF1 rekombináns expressziós vektort állítjuk elő.*

10. Eljárás túlzott gamma-interferon-termeléssel társult betegség kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve, hogy egy 1. igénypont szerint előállított BCRF1-fehérje hatásos mennyiségét valamilyen gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval és/vagy segédanyaggal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.*

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy BCRF1-fehérjeként egy, az 1. számú szekvenciában megadott aminosavszekvenciával meghatározott nyílt leolvasási keret szerinti érett fehérjét alkalmazunk.*

12. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy BCRF1-fehérjeként a 3. számú szekvenciában megadott aminosavszekvenciával rendelkező fehérjét alkalmazzuk.*

13. A 10–12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy 1–10 mg/testtömeg-kg/nap tartományba eső BCRF1-mennyiség intravénás beadására alkalmas gyógyszerkészítményt állítunk elő.*

14. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy paraziták által kiváltott betegség kezelésére szolgáló gyógyszerkészítményt állítunk elő.*

15. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy allergiás betegség kezelésére szolgáló gyógyszerkészítményt állítunk elő.*

16. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy a fő hisztokompatibilitási komplexszel (MHC) összefüggő immunrendellenesség kezelésére szolgáló gyógyszerkészítményt állítunk elő.*

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy reumatoid artritisz, szisztémás lupus erythematosus (SLE), vészes izomgyengeség (myasthenia gravis), inzulinfüggő cukorbetegség vagy pajzsmirigygyulladás kezelésére szolgáló gyógyszerkészítményt állítunk elő.*

1. ábra



