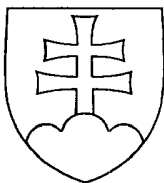


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 12.01.95
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/181 492
(32) Dátum priority: 13.01.94
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 09.07.97
(86) Číslo PCT: PCT/US95/00408, 12.01.95

(21) Číslo dokumentu:

906-96

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

C 12N 15/12,
C 12N 15/70,
G 01N 33/68,
C 07K 14/725,
A 61K 38/17

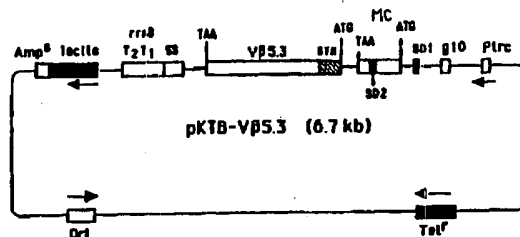
(71) Prihlasovateľ: T Cell sciences, INC., Needham, MA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Makrides Savvas C., Bedford, MA, US;
Kung Patrick C., Lexington, MA, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Proteíny V regiónu antigénneho receptora T buniek a metódy ich prípravy**

(57) Anotácia:

Je opísaný spôsob produkcie kompletných proteínov V regiónu antigénneho receptora T buniek. Ďalej spôsoby exprese proteínov, ako aj expresné vektory pre zvýšenú produkciu kompletných proteínov V regiónu antigénneho receptora a Vbeta 5.3 región proteínu. Opísané proteíny majú využitie v diagnostike a terapii chorôb spojených s imunitou.



Proteíny V regiónu antigénneho receptora T buniek a metódy ich prípravy

Oblasť techniky

Prekladaný vynález sa všeobecne týka imunológie a medicíny a týka sa úplne rekombinantných proteínov V oblasti receptora T buniek (TCR), expresných vektorov s cieľom produkcie komerčne využiteľného množstva rekombinantných proteínov V regiónu antigénneho receptora T buniek a metód použitia úplne rekombinantných proteínov V regiónu antigénneho receptora T buniek na diagnózu a liečenie chorôb alebo porúch imunitného systému.

Doterajší stav techniky

1. ANTIGÉNNY RECEPTOR T BUNIEK

Imunitná odpoveď na cudzorodé antigény je rozdelená do protilátkovej odpovede, sprostredkovanej B bunkami a bunkovej imunity, sprostredkovanej T bunkami. Receptorové molekuly používané B bunkami na rozpoznanie antigénu sú imunoglobulíny, ktoré rozoznávajú konformačné epitopy na globulárnych proteínoch. Antigénne receptory na T bunkách majú vzťah k imunoglobulínom, ale viažu spracovanú antigénnu molekulu v asociácii s molekulami hlavného histokompatibilného systému (MHC) (Dembic et al., 1986, Immunol. Today, 7:308).

TCR gény, rovnako ako imunoglobulínové gény, sú zložené kódujúcich regiónov (alebo génových segmentov), ktoré sa preskupujú počas vývoja T buniek (Chien et al., 1984, Nature, 312:31-35, Hedrick et al., 1984, Nature, 308: 149-153, Yanagi et al., 1984, Nature, 308:145-149). Lokus ľudského beta reťazca receptora T buniek bol rozsiahle študovaný od klonovania prvou cDNA kódujúcou beta reťazec (Yanagi, Y. et al. 1984, Nature, 308:145-149, Hedrick et al. 1984, Nature, 308:149-152, Siu et al., 1984, Cell, 37:393-401). Tento lokus je komplex génov

obsahujúci oblasti kódujúce známe regióny alebo domény beta reťazca: variabilné (V), "diversity" (D) a joining (J) domény. Tieto kódujúce regióny sa v somatických bunkách zúčastňujú prestavby spolu s oblasťami kódujúcimi konštantnú (C) doménu (Chien et al., 1984, *Nature*, 309: 322-326). In situ štúdie identifikovali umiestenie TCR beta lokusu na chromozóme 7 v 7q35 (Isobe et al., 1985, *Science*, 228:580). Podľa novších hodnotení sa tento komplex rozkladá na viac ako 600kb a obsahuje 70-80 segmentov regiónu (Concannon et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83: 6598-6602, Tillinghas et al., 1986, *Science*, 223: 879-883, Kimura et al., 1987, *Eur. J. Immunol.*, 17: 375-383, Lai et al., 1988, *Nature*, 331: 543-546). Tieto génové segmenty V regiónu susedia s dvoma tandemovo organizovanými regiónmi, z ktorých každý zahŕňa D a C génový segment nasledovaný nakopím šiestich alebo siedmich génových segmentov J regiónu (Tunnacliffe et al., 1985, *Nucleic Acid res.*, 13: 6651-6661, Toyonaga et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 8624-8628). Po neúspešnej prestavbe V, D a J kódujúcich regiónov (génových segmentov) sa translatovaný polypeptid beta reťazca páruje s TCR alfa reťazcom a môže byť expriovaný na povrchu T buniek (uvedené Kronenbergom et al., 1986, *Ann. Rev. Immunol.*, 4: 529-591).

TCR alfa a deltalokus sú vedľa na chromozóme 14. TCR delta kódujúce regióny sú úplne vnútri alfa génového lokusu (Sataanarayna et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8166-8170, Chien et al., 1987, *Nature*, 330: 722-727, Elliot et al., 1988, *Nature*, 1985, 331: 627-631). Odhaduje sa, že je 45-50 Valfa kódujúcich regiónov (Becker et al., 1985, *Nature*, 317: 430-434), zatiaľ čo je len približne 10 Vdelta kódujúcich regiónov (Chien et al., 1987, *supra*). V periférnej krvi sa javia byť dva Vdelta kódujúce regióny predominantne expriované, konkrétne Vdelta 1 a Vdelta 2.

Gama TCR gén bol najprv identifikovaný v myšiach (Saito et al., *Nature*, 309: 757-762, Kranz et al., 1985, *Nature*, 313, 762-755, Hayday et al., 1985, *Cell*, 40: 259-269) a potom v ľuďoch (Lefranc et al., 1985, *Nature*, 316: 464-466, Murre et al., 1985,

Nature, 316: 549-552). Ľudský gama TCR lokus je zrejme zložený z 5 až desiatich V, piatich J a dvoch V kódujúcich regiónov (Dialynas et al., 1986, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 83: 2619).

TCR diverzita a tak špecificita T buniek, je odvodená z niekoľkých prameňov (Barth et al., 1985, Nature, 316: 517-523, Fink et al., 1986, Nature, 321: 219-225):multiplicity génových segmentov germinatívnych línií (Chien et al., 1984, Nature, 309: 322-326, Malissen et al., 1984, Cell, 37: 1101-1110, Gascoigne et al., 1984, Nature, 310: 387-391, Kavalier et al., 1984, Nature, 310: 421-423, Siu et al., 1984, Nature, 311: 344-349, Pattern et al., 1984, Nature, 312: 40-46), kombinatoriálnou diversitou spôsobenou nahromadením rôznych V, D a J kódujúcich regiónov (Siu et al., 1984, Cell 37: 393-401, Goverman et al., 1985, Cell. 40: 859-867) a junkčnou flexibilitou, diverzitou N regiónu a použitím buď hromadných D regiónov alebo ktoréhokoľvek z troch translačných čítacích rámcikov pre Dbeta segmenty. TCR diverzita zrejme nepramení z mechanizmu somatickej hypermutácie pozorovanej pre imunoglobulíny (Barth et al., supra.). Výsledkom tohto mechanizmu je, že TCR sú generované s odlišnosťami v ich amino-terminálnych alebo N-terminálnych doménach (t.j. sú konštruované z kombinácií V, D a J kódujúcich regiónov), ale inde sa zhodujú, zahrnujúc do toho ich karboxy-terminálne alebo C-terminálne domény (ktoré tvoria konštantné regióny TCR). V súlade s tým je generovaný extrémne široký repertoár TCR molekúl.

Štúdie štruktúry a diverzity variabilných kódujúcich regiónov ľudských TCR beta reťazcov viedli k rozdeleniu týchto kódujúcich regiónov do odlišných podrodín V regiónu (Tillinghast et al., 1986, Science, 223: 879-883, Concannon et al. 1986. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6598-6602, Boerst et al., 1987, J. Immunol., 139: 1952-1959). Každá z podrodín V regiónu môže byť charakterizovaná zhodou sekvencií a obsahuje podobné kódujúce regióny vykazujúc tak väčšiu ako 75% podobnosť v DNA sekvencií. Napríklad šesťnásť myšacích Vbeta sekvencií bolo kategorizovaných do štrnástich odlišných podrodín pomocou stanovenej, ale jednoduchšej numerickej nomenklatúry pre Vbeta génové segmenty

(pozri Barth et al., 1985, "The Murine T Cell receptor Employs a limited repertoire of expressed Vbeta gene segments", Nature, 316: 517-523). V súlade s touto nomenkaltúrou členovia podrodiny majú spoločnú prvú číslicu líšia sa v druhej, preto Vbeta8.1, Vbeta8.2 a Vbeta8.3 sú členmi Vbeta8 podrodiny. Podobný systém bol navrhnutý pre ľudské kódujúce regióny. Pre ľudí bolo približne 60 Vbeta kódujúcich regiónov rozdelených do aspoň 24 rodín (Toyonaga a Mak, 1988, Ann. Rev. Immuno. 5: 585, Wilson et al., 1988, Immunol. Rev., 101: 149 a Robinson, M.A., 1991, J. Immunol., 146: 4392).

2. T BUNKY V AUTOIMUNITE

T bunky hrajú svoju úlohu v diferenciácii a regulácii efektorových mechanizmov v imunitnom systéme (Paul et al., 1987, Science, 195: 1293-1300). Spoločné rozpoznávanie antigénu a molekúl hlavného histokompatibilného systému musí byť špecifické a precízne regulované, pretože nevhodná imunitná odpoveď vedie k autoimunitě. Niekoľko laboratórií študovalo choroby, v ktorých sa javí byť nevhodná imunitná odpoveď, ako je autoimunita a niektoré formy imunodeficiencií a určovalo úlohu T buniek v patogenéze takýchto chorôb.

Niektoré nežiadúce imunitné odpovede sú charakterizované klonálnou alebo oligoklonálnou expanziou zvláštnej TCR kompozície, ako napríklad pri malignitách, ktoré vedú k T-bunkovým leukémiám alebo lymfómom (pozri napr. Jack et al., 1990, Am. J. Pathol., 136: 17, Nitta et al., 1990, Science, 249: 672 a Yoshino et al., 1991, Int. J. Cancer, 47: 654). Pokiaľ ide o T bunkové leukémie a lymfómy, hrá TCR úlohu ako unikátny nádorový marker, pretože je stabilne prestavovaný a prezentovaný na povrchu buniek. Zvláštna TCR kompozícia je tiež naznačená pre orgánové štepy, ktorých T lymfocyty majú TCR reaktívny s MHC antigénmi jednotlivých darcov, napríklad darcov kostnej drene.

Niekoľko skupín popísalo selektívnu expresiu TCR v regiónu v istých autoimunitných situáciách. Napríklad Grunvlad et al.

uviedol ako prednostnú expresiu V alfa 2.3 génového produktu na CD 4+ bunkách z bronchoalveolárnej laváže v porovnaní s lymfocytmi z periférnej krvi pacientov so sarkoidózou (Grunvlad et al. 1992. Eur. J. Immunol., 22: 129). Pokiaľ ide o Kawasakiho chorobu, bola uvedená prednostná expanzia Vbeta2 a Vbeta8 T buniek na začiatku choroby (Abe J. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4066).

Reumatoidná artritída (RA) bola široko študovaná z týchto hľadísk. Niektorí výskumníci uviedli prednostnú expanziu istých podskupín T buniek, t.j. DerSimonian et al., 1993, J. Exp. Med., 177: 1623 (preferenčná expanzia T buniek nesúcich V alfa 12.1 v CD8+ T lymfocytoch periférnej krvi). Stamenkovic et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 1179 (T bunky infiltrujúce synoviálnu membránu kultivovanej IL2 boli oligoklonálne pri Southern bol analýze). Paliard et al., 1991, Science, 253: 325 (hypotéza, že superantigénom aktivované Vbeta14 T buniek, vrátane autorekatívnych T buniek, expandujú klonálne a migrujú do synoviálnej tekutiny RA pacientov), Howell et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10921 (uvádza použitie jednotlivých génov Vbeta3, 14 a 17 V regiónu T buniek v IL 2R+ bunkách zo synoviálnej tekutiny RA pacientov), Uematsu et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8534 (použitie oligoklonálnych génov V oblasti T buniek v T bunkách synoviálnej tekutiny jednotlivých RA indivíduí), Medzinárodná Patentová Publikácia WO 90/06758 (implikácia Vbeta3, 9 a 10 pre RA).

Zápalové črevné choroby boli tiež široko študované. Niekoľko skupín uviedlo expanziu populácie T buniek alebo preferenčné použitie génu V regiónu TCR t.j. Posnett et al., 1990, J. Clin. Invest., 85: 1770, Spencer et al., 1991, J. Clin. Pathol., 44: 915, Treidosiewitz et al., 1991, Clin. Exp. Immunol. 84: 440, Van Kerckhove et al., 1992, J. Exp. Med., 175: 57. Iní popísali preferenčné využitie TCR génu pokiaľ ide o Mycobacterium leprae (van Shooten et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11244, Wang et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 188).

Roztrúsená skleróza (MS) je autoimunitná choroba charakterizovaná infiltráciou centrálného nervového systému mononukleárnymi a demyelinizáciou. Aj keď je patogenéza MS neznáma, pri vzniku choroby sa uplatňujú ako vplyvy genetické, tak aj vplyvy prostredia. Hlavné zložky genetickej predispozície zahŕňujú asociáciu choroby s jednotlivými haplotypmi triedy II hlavného histokompatibilného komplexu (MHC) (Terasaid et al., 1976, Science, 193: 1245-1247., Ho et al., 1982, Immunogenetics, 15: 509-517, Spielman et al., 1982, Epidemiol. Rev., 4: 45-65, Francis et al., 1986, Lancet, 1: 211, Elia et al., 1987, Disease Markers, 5: 89-99, Urban et al., 1988, Cell, 54: 577-592, Vanderbark et al., 1989, Nature, 341: 541-544, Howell et al., 1989, Science, 246: 668-670).

Bolo ukázané, že T bunky izolované z cerebrospinálneho moku pacientov trpiacich MS využívajú obmedzenú sadu génov V regiónu TCR. Demonštrácia in vivo aktivovaných T buniek špecifických voči myelobázickému proteínu (MBP) implikovala MBP reaktívnej T bunky v patogenéze chorôb (Wucherpfennig, K. W. et al., 1990, Science, 248: 1016-1019). Štúdiá s využitím amplifikácie cDNA polymerázovou reťazcovou reakciou (PCR) s TCR Vbeta primérmí ukázala, že MBP reaktívnej T bunkovej línie využívajú len obmedzené množstvo Vbeta kódujúcich regiónov (Wucherpfennig, K. W. et al., 1990, supra (Vbeta17 a v menšom rozsahu Vbeta12 sú často využívané na rozpoznanie imunodominantného regiónu ľudského autoantigénu MBP), Oksenberg, J. R. et al., Nature, 362: 68-70 (prestavba Vbeta5.2 a/alebo Vbeta5.3 génov bola detegovaná v mozgoch pacientov s istým HLA fenotypom), Kotzin, B. L., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9161-9165 (prednostné použitie beta reťazcov variabilného regiónu 5.2/5.3 a v menšom rozsahu Vbeta6.1 pozorované medzi MBP špecifickými klonmi pacientov s MS). Výsledky niektorých štúdií tiež označujú, že je obmedzená expresia génov TCR Valfa v MS mozgových léziách (Oksenberg, J. R. et al., 1990, Nature, 345: 344-346).

3. PRÍSTUPY K TERAPII SPROSTREDKOVANEJ T BUNKAMI

V minulosti boli snahy selektívne ovplyvniť T bunkovú populáciu jednotlivca zamerané na vakcináciu pomocou celých živých alebo atenuovaných T lymfocytov (pre prehľad tohto prístupu pozri Cohen, I. R., 1986, Immunol. Rev., 94: 5-21), alebo s peptidovou vakcínou založenou na selekcii špecifickej časti peptidu TCR V regiónu. Tieto prístupy boli založené na novom zistení, že potenciálne patogénne T bunky preferenčne používajú limitovanú sadu V kódujúcich regiónov. Prístup vyvinutý Cohenom používa živé alebo atenuované T bunky ako vakcínu na liečenie alebo prevenciu, inter alia, experimentálne autoimunitnej encefalomyelitídy (EAE). Avšak tento prístup je obmedzený závislosťou od izolácie klonov pre ochorenie špecifických T buniek: je nevyhnutné liečiť každého pacienta jeho vlastnými expandovanými bunkami, ako vyžaduje "šitá na mieru" alebo individuálna terapia (pozri Zhang et al., 1993, Science, 261: 1451).

Iní predpokladali terapeutické využitie TCR peptidov založených na využití TCR V regiónu (Offner H., 1991, Science, 251: 430 (liečba peptidmi založenými na TCR Vbeta8 aminokyselinovaných sekvenciách redukovala vážnosť choroby a akcelerovala zotavenie potkanov Lewis), Hashim, G. A., et al., 1992, J. Immunol., 149: 2803-2809, Ofner, H. et al., 1992, J. Immunol., 148: 1706-1711, Offner, H. et al., 1991, J. Immunol., 146: 4165-417, ale pozri Sun, D. 1992, Cell. Immunol., 141: 200-210). Tieto peptidy sú všeobecne krátke peptidy, obvykle s dĺžkou medzi 8-25 aminokyselinami, a výnimočne s dĺžkou väčšou ako 30 aminokyselín. Napríklad 21 aminokyselinový peptid prítomný na TCR reťazci asociovaný s EAE bol použitý na prevenciu EAE potkanov Lewis (Vandenbark, A. A. et al., 1989, Nature, 341: 541-544, Vandenbark, A. A., International Patent Publication WO/01133, pozri tiež Janeway, C. A. 1989, Nature, 341: 482-483). Iní popísali, že ešte kratšie peptidy s 8-11 aminokyselinami, korešpondujúce s časťou beta reťazca VDJ regiónu alebo J alfa regiónu sa ukazujú byť efektívne ako vakcíny používané buď na prevenciu alebo redukciu vážnosti EAE na modele potkana (Howel, M. D. et al., 1989, Science, 246: 668-671, Howel, M. D. et al.,

Medzinárodná patentová publikácia WO 92/12996).

Peptidy odvodené od TCR proteínu boli všeobecne vybrané ako kandidáti pre autoimunitné terapeutiká vzhľadom na ľahkú peptidovú syntézu a vzhľadom na to, že žiadna z metód nebola pretým vhodná pre produkciu dlhších proteínov TCR V regiónu v dostatočnom množstve a so signifikantnou biologickou aktivitou. Ešte dôležitejšie je to, že hlavný nedostatok malých syntetických peptidov je ten, že ich použitie vyžaduje predpovedanie jednotlivcej sekvencie, ktorá bude efektívna pri modulovaní imunitnej odpovede. Určenie musí byť uskutočnené ako antigénne a imunogénne vlastnosti navrhnutého peptidu, ako napríklad výskyt v hypervariabilnom alebo komplementaritu určujúcom regiónu (CDR) V regiónu. Navyše, veľkosť navrhovaných peptidov odvodených z jednotlivých TCR musí počítat s udrжанím správnej epitopovej štruktúry na navodenie aktivity T supresorových buniek alebo na navodenie uvoľnenia protilátok proti subpopulácii T buniek nesúcej jednotlivý TCR (s ktorým peptid korešponduje). Peptidy s takýmito vlastnosťami vyžadujú značný čas a výskum a v mnohých prípadoch zamýšľanej terapie na ľudí nemôžu byť nevyhnutné experimenty uskutočnené z humánnych alebo etických dôvodov.

Navyše, aby sa získala špecifická antigénna odpoveď prostredníctvom regulačných T buniek, musí byť peptid naviazaný na MHC molekuly jednotlivca. MHC antigény prítomné na povrchu buniek majú polymorfne regióny v ktorých sú špecifické alely asociované s jednotlivými indivíduami. Navyše, jednotlivci budú mať dva haplotypy, čo znamená, že tu budú dve odlišné alely jednotlivého MHC antigénu pre rovnaký lokus. Nie všetky peptidy majú kapacitu pre väzbu na MHC antigény a ani všetky MHC antigény sa neviažu na jednotlivé peptidy, pretože existuje množstvo MHC antigénov pre každý haplotyp. Preto vhodnosť takéhoto peptidového prístupu k T bunkami sprostredkovanej terapii musí byť determinovaná pre haplotyp každého jednotlivca, vyžadujúc tak vytvorenie peptidov pre jednotlivých pacientov.

4. PRODUKCIA SOLUBILNÝCH ANTIGÉNNÝCH RECEPTOROV T BUNIEK

Produkcia väčšieho množstva solubilných TCR proteínov pomocou rekombinantnej techniky boli problematické z niekoľkých dôvodov. Hlavnou prekážkou pri produkcii solubilného antigénneho receptora T buniek je sekrécia v neprítomnosti transmembránového regiónu (Traunecker A. et al., 1986, Immunol. Today, 10: 29-32). Jeden výskumník bol schopný ukázať sekréciu celej dĺžky monomérneho beta reťazca myšacieho TCR vrátane V, D a J regiónu nasledovanú skrátenou formou Cbeta regiónu. Metodika využívala výhody homológie medzi karboxylovým koncom ľahkého reťazca imunoglobulínu a sekvenciou okolo Cys 241 v TCRbeta reťazci. Výsledný konštrukt využíval chimerický gén kódujúci sekvenciu k-reťazca úvodného peptidu od MPC 11 a rearanžovaný VDJ exon. Výsledný konštrukt bol exprimovaný v cicavčích bunkách a bol detegovaný v bunkovom supernatante. Metóda nebola presvedčivá, avšak znamenala získanie úplnej dĺžky proteínu V regiónu pri neprítomnosti cudzích proteínových sekvencií, pretože sekrécia bola závislá od prítomnosti skráteného Cbeta exonu (Gasoigne, N., 1990, J. Biol. Chem., 265 (16): 9296-9301).

Iná skupina sa pokúšala dosiahnuť expresiu solubilnej formy TCRbeta reťazcov v biochemicky signifikantnom množstve expresiou rekombinantného TCR heterodiméru ukotveného pomocou fosfatidyl inozitol glykánovej väzby. Metóda produkovala malé množstvo (0,5 mg) množstva celého TCR reťazca, ktorý vyžadoval štiepenie od povrchu transfekovaných buniek fosfatidyl inozitol špecifickou fosfolipázou C (Lin, A. Y., 1990, Science, 249: 677-679).

Iní produkovali chimerické molekuly miešaním variabilných a konštantných domén myšacieho TCR s konštantnou oblasťou ľahkého reťazca k-imunoglobulínu. Výskumníci boli schopní dosiahnuť malé množstvo secernovanej solubilnej formy heterodimerického alfaTCR (Gregoire, C. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8077-8081). Gregoire a spol. predviedli myšaciu chiméru zloženú z Calfa a Valfa génov KB5-C2 spojených s C regiónom kapa ľahkých reťazcov monoklonálnej protilátky S105. Tiež predviedli VbetaCbetaC kapa chiméru. Obidve boli transfekované do cicavčích

B-myelónových buniek, ktoré neexprimovali ľahké ani ťažké reťazce natívnych imunoglobulínov (pozri tiež Weber, S. et al., 1992, Nature, 356: 793-795).

Novotny a spol., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9646-9650, demonštrovali metódu produkcie solubilného TCR s antigén-kombinujúcimi vlastnosťami. Syntetický oligo linkér bol klonovaný do C konca Vbeta a N konca Valfa regiónu vytvárajúc tým jednoreťazcový Vbeta Valfa. Vzniknutý expresný vektor kóduje pelB leader nasledovaný okamžite v rámci Vbeta linkérom a Valfa segmentmi. Expresia konštruktu je pod kontrolou lacZ promotora a je preto IPTG-indukovateľná.

Nedávno jedna skupina ukázala sekréciu malého množstva V regiónu T bunkového receptora fuzionovaného ku karboxy-terminálnemu polyhistidínovému "chvostu". Plazmidy obsahujú pelB leader a sú pod kontrolou chemicky indukovaného promotora (Ward, E. S., 1991, Scan. J. Immunol., 34: 215-220). Práca napriek tomu však zlyháva v popise ako získať proteíny V regiónu antigénneho receptora T buniek pri absencii fúzneho partnera alebo ako získať komerčne využiteľné množstvo receptora V regiónu.

Preto je tu veľká potreba prostriedkov a farmaceutických kompozícií, ktoré majú vlastnosti špecificity pre cielenú autoimunitnú odpoveď, predvídateľnosti v ich selekcii a výhodnosti a reprodukovateľnosti prípravy.

Podstata vynálezu

Predkladaný vynález sa týka vyššie uvedených problémov tým, že poskytuje prvý raz úspešnú produkciu univerzálneho prostriedku na liečenie chorôb sprostredkovaných uvedenými T bunkami, v ktorých sú implikované podskupiny T buniek. Presnejšie, vynález poskytuje využiteľné množstvo kompletných proteínov V regiónu TCR, ktoré môžu byť prirodzene spracované, poskytujúc tak aktívne fragmenty pre in vivo spracovanie a prezentované antigén

prezentujúcimi bunkami každého jedinca, pri eliminácii potreby "na mieru šitých" terapeutických prostriedkov. Tiež je poskytovaná trieda rekombinantých expresných vektorov na produkciu proteínov V regiónu TCR v baktériách. Rekombinantné proteíny V regiónu TCR tohto vynálezu sú využiteľné pri liečbe, prevencii alebo supresii imunitných chorôb. V inom využití môžu byť TCR molekuly kombinované v zmesi s farmaceuticky prijateľným nosičom s cieľom použitia ako terapeutickú kompozíciu. V inom využití môžu byť nárokované proteíny V regiónu TCR použité diagnosticky na charakterizáciu jednotlivých imunitných chorôb. Proteíny TCR V regiónu predkladaného vynálezu môžu byť použité ako diagnostické sondy vzhľadom na ich schopnosti viazať sa na autoprotílátky. Výhodou predkladaného vynálezu je to, že proteíny V regiónu antigénneho receptora T buniek sú exprimované v neprítomnosti fúzných proteínov alebo afinitných koncoviek. Ďalšou výhodou predkladaného vynálezu je to, že proteíny V regiónu TCR sú produkované v komerčne prijateľnom množstve, ktoré je použiteľné na prípravu kompozícií, ktoré sú terapeuticky efektívne pri liečení autoimunitných chorôb sprostredkovaných T bunkami.

Vynález ďalej poskytuje expresný vektor na produkciu čistej kompletnej molekuly V regiónu TCR. Expresný vektor vynálezu zahrnuje ako základnú jednotku kódujúci región pre V región antigénneho receptora T buniek. TCR kódujúci región vynálezu molekula nukleovej kyseliny kódujúca kompletný proteín V regiónu TCR. Vo výhodnej realizácii zahrnuje TCR kódujúci región štrukturálne kódujúce sekvencie pre Vbeta5.3 región.

Expresné vektory tu popísané poskytujú prostriedky pre indukovateľnú expresiu proteínov V regiónu TCR. V preferovanej realizácii je kódujúca sekvencia pre V región antigénneho receptora T buniek pod transkripčnou kontrolou indukovateľného bakteriálneho promotora. V súlade s týmto vynálezom je indukovateľný bakteriálny promotor subjektom buď chemickej, alebo termálnej regulácie. Najlepšie je indukovateľný bakteriálny promotor subjektom termálnej indukcie.

V jednej realizácii zahrnuje expresný vektor predkladaného vynálezu regulačné gény kódujúce proteíny schopné viazať sa na promotor a tak schopné potlačovať transkripciu z indukovateľného promotora. V preferovanej realizácii je promotor odvodený od *E. coli* lac operónu a regulačné gény obsahujú funkčnú mutáciu *E. coli* lacI represorového génu. Tento mutantný lacI gén (lacIts) kóduje teplotne senzitívny represorický proteín a použitie týchto lacIts génov dovoľuje termálnu indukciu promotora. V preferovanej realizácii je indukovateľný bakteriálny promotor trc promotor a termálna indukcia je poskytnutá lacIts regulačným génom.

V jednej realizácii je regulačný gén umiestený na kotransformovanom vektore. V inej realizácii je regulačný gén umiestený na chromozómoch hostiteľských bakteriálnych buniek. V preferovanej realizácii je regulačný gén umiestený na rekombinantnom expresnom vektore. V ďalšej preferovanej realizácii transkripčný smer mutantného lacI génu má rovnakú orientáciu ako štrukturálny gén antigénneho receptora T buniek, ktorý má byť exprimovaný.

Rekombinantné expresné vektory predkladaného vynálezu môžu výhodne obsahovať kódujúce sekvencie pre leader alebo signálny peptid. Takáto leader sekvencia, fuzionovaná v rámčeku a 5' do kódujúceho regiónu TCR V regiónu, ktorý má byť exprimovaný, riadi syntézu proteínu V regiónu TCR majúceho N-terminálny leader peptid, ktorý postupne riadi sekréciu rekombinantného proteínu cez membránu hostiteľskej bunky. Iná realizácia predkladaného vynálezu nevyužíva leader sekvencie a požadovaný produkt V regiónu je izolovaný z buniek, t.j. extrakciou moču.

V preferovanej realizácii obsahuje rekombinantný expresný vektor predkladaného vynálezu v 5'-3'smere: trc promotor, väzbové miesto pre ribozóm, voliteľnú leader sekvenciu, kódujúci región pre kompletný V región antigénneho receptora T buniek, stop kodón, jeden alebo viac transkripčných terminátorov, lacIts regulačný gén tak, že smer transkripcie je rovnaký ako pre

kódujúci región V regiónu antigénneho receptora T buniek, bakteriálny zdroj replikácie a gén rezistencie pre tetracyklín.

Tento vynález tiež poskytuje metódy produkcie proteínov V regiónu TCR v signifikantne väčšom množstve ako bolo predtým popísané.

Predkladaný vynález poskytuje kompozície a metódy na liečenie pacientov majúcich imunitné poruchy. Takáto liečba zahŕňa podanie kompozícií v súlade s týmto vynálezom subjektov, ktoré potrebujú takúto liečbu, v množstve a dobe vhodnej na reguláciu uvedených porúch imunity. Výhodou prezentovaného vynálezu je to, že kompozície vynálezu dovoľujú liečenie imunitných porúch bez potreby selekcie jednotlivých peptidových fragmentov a bez upravovania jednotlivých kompozícií pre jednotlivých liečených jedincov.

Vynález sa tiež týka použitia proteínov kompletného V regiónu antigénneho receptora T buniek v terapii autoimunitných chorôb a porúch. V špecifickej realizácii sa vynález týka použitia kompletného Vbeta5.3 proteínu v terapii. V inej realizácii poskytuje vynález kompletné proteíny V regiónu antigénneho receptora T buniek na výrobu lieku na liečenie autoimunitných chorôb a porúch. Tak je v jednej realizácii vynález schopný použiť kompletné proteíny V regiónu vo výrobe liečiva na liečenie imunitných chorôb ako je MS.

Popis obrázkov na pripojených výkresoch

Obr.1 - Kompletná nukleotidová sekvencia [SEQ ID NO.25 a SEQ ID NO.26] a aminokyselinová sekvencia [SEQ ID NO.27] kompletného Vbeta5.3 proteínu vynálezu.

Obr.2 - Plazmidová mapa pKTB-Vbeta5.3. Tento plazmid obsahuje P_{trc}, trc promotor, g10, g10 leader génový segment z bakteriofágu T7, SD1, väzbové miesto pre ribozómy 1, MC, minicistron kódujúci väzbové miesto pre ribozóm 2 (SD2) AAG GAG

(pozri SEQ ID NO.28 pre kompletnú nukleotidovú sekvenciu minicistronu) a peptid Met Tyr Arg Leu Asn Lys Glu Glu (SEQ ID NO.29), STII, STII leader sekvencie, Vbeta5.3, Vbeta5.3 kódujúci región, T1T2, transkripčné terminátory rrnB operónu, lacIts gén kódujúci teplotne senzitivny lac represor, Ori, zdroj replikácie a Tet^s, gén rezistencie na tetracyklín.

Predkladaný vynález popisuje rekombinantné expresné vektory a metódy na dostatočnú produkciu väčšieho množstva proteínov V regiónu antigénneho receptora T buniek a ich využitie, zahrnujúc do toho diagnózu, liečenie, prevenciu alebo supresiu imunitných chorôb alebo porúch.

S cieľom produkcie vysokých hladín kompletných proteínov V regiónu TCR bola vyvinutá séria vektorov. Navyše je poskytnutá metóda produkcie komerčne využiteľného množstva kompletných rekombinantných proteínov V regiónu TCR použitím expresných vektorov predkladaného vynálezu. Metódy a expresné vektory predkladaného vynálezu sú unikátne vďaka tomu, že poskytujú produkciu kompletného V regiónu antigénneho receptora T buniek v neprítomnosti iných proteínových sekvencií alebo fúzných partnerov. Ako je detailne popísané v podstate vynálezu, supra, V región antigénneho receptora T buniek bol v minulosti produkován len ako časť väčšieho proteínu a vo veľmi nízkej úrovni. Tieto cudzie proteíny môžu spôsobovať nežiadúcu imunogenicitu, ak sú použité in vivo a sú často označené povolovacími úradmi ako nedovolené znečistenie. Predtým čistené proteíny V regiónu zahrnujú iné regióny TCR, ako je C región, fuzionovaný s V regiónom. Iné konštruované expresné systémy poskytovali TCR V región ako chimerický proteín, t.j. V región fuzionovaný na časť imunoglobulínovej molekuly.

Expresné vektory a metódy tohto vynálezu poskytujú ďalej zvýšené hladiny exprese proteínov V regiónu antigénneho receptora T buniek. Primárnym úmyslom pri produkcii proteínu, ktorý má komerčné využitie, napríklad vo výskume, diagnostike a terapii, je vyrobenie komerčne využiteľného množstva proteínu.

Predkladaný vynález preto poskytuje zvýšenú produkciu proteínov V regiónu TCR. Predkladaný vynález umožňuje produkciu proteínov V regiónu vo väčšom množstve, t.j. od 1 do 500 mg/l bakteriálnej kultúry, alebo viac. Výhodne je úroveň produkcie proteínov aspoň 100 mg/liter. V najpreferovanejšej realizácii predkladaný vynález poskytuje produkciu aspoň 300 mg Vbeta proteínu na liter bakteriálnej bunkovej kultúry.

Metódy a expresné vektory predkladaného vynálezu umožňujú produkciu proteínov V regiónu TCR pri absencii cudzích proteínových sekvencií. Vynález tak eliminuje niekoľko krokov spojených so získavaním purifikovaných proteínov V regiónu TCR, ak je pripravovaný podľa predchádzajúceho postupu. V jednej realizácii umožňuje vynález expresiu zvýšeného množstva proteínov V regiónu pomocou termálnej indukcie, ktorá vylučuje nevyhnutnosť eliminovania chemických indukčorov, ako je IPTG. Pretože proteíny V regiónu TCR sú produkované v súlade s vynález bez prítomnosti cudzích proteínov, umožňuje vynález zjednodušenú produkcie relatívne čistých produktov. Vynález eliminuje ďalšie spracovateľské kroky, ako je zavedenie enzýmov alebo chemických prostriedkov do systému vylúčenia proteínov, ako sú akékoľvek fuzionované non-TCR peptidové segmenty alebo afinitné končeky. Takéto manipulácie nie sú len vhodné na redukciu množstva získaného V regiónu produktu, ale tiež vkladajú elementy, ktoré musia byť eliminované, t.j. pomocou ďalších purifikačných krokov.

1. V REGIÓN ANTIGÉNNEHO RECEPTORA T BUNIEK

Proteín V regiónu antigénneho receptora T buniek predkladaného vynálezu je kompletný V región antigénneho receptora T buniek. Kompletný proteín V regiónu TCR je kódovaný kódujúcim regiónom pre V región antigénneho receptora T buniek. Kódujúci región TCRV regiónu je nukleotidová sekvencia kódujúca kompletný proteín V regiónu antigénneho receptora T buniek. V rozsahu tohto vynálezu zahrnuje V región variabilný región antigénneho receptora T buniek. V rozšírenom pohľade môžu byť poznatky tohto vynálezu aplikované s cieľom získania zvýšenej

expresie TCR proteínov, vrátane V regiónu a navyše, celého alebo čast' D a/alebo J regiónu. Proteíny V regiónu TCR sú produkované pri neprítomnosti cudzích proteínových sekvencií, ako je napríklad iný TCR región, tak ako konštantný región, transmembránový región alebo cytoplazmatický región. Navyše, proteín V regiónu TCR vynálezu je produkovaný v neprítomnosti non-TCR fúznych partnerov, ako sú afinitné konččky. Navyše, proteín V regiónu TCR nie je produkovaný ako súčasť väčšieho chimerického proteínu obsahujúceho časť inej proteínovej molekuly, ako je imunoglobulínový proteín.

Rozpoznanie toho, že DNA sekvencia kódujúca jeden z komplementaritu určujúcich regiónov (CDR) V regiónu receptorov T buniek môže aktuálne preklenúť známe spojenie medzi V a D kódujúcimi regiónmi (tak ako v prípade CDR 3 Vbeta5.3) ako je tu použité, ukazuje, že "celá dĺžka" kódujúceho regiónu V regiónu môže zahŕňať celú kódujúcu sekvenciu takéhoto CDR, ktorý prekenuje V-D spojenie, časť takéhoto CDR, ktorý je len umiestený v známom V regióne alebo žiadnu zo sekvencií kódujúcich takýto CDR. Navyše, kompletný proteín V regiónu antigénneho receptora T buniek predkladaného vynálezu môže byť akýkoľvek V región antigénneho receptora T buniek a nie je obmedzený len na Vbeta regióny (t.j. regióny TCR beta reťazca). Preto proteíny V regiónu antigénneho receptora T buniek môžu byť variabilné regióny alfa podjednotky, delta podjednotky alebo gama podjednotky.

V preferovanej realizácii je proteín V regiónu TCR akýkoľvek V región antigénneho receptora T bunky, pre ktorý je vhodná kompletná kódujúca sekvencia. Metódy na získanie kompletnej kódujúcej sekvencie predkladaného vynálezu sú v obore dobre známe. DNA sekvencie domén ľudského V regiónu môžu byť izolované podľa dobre známych postupov z celého množstva ľudských buniek. Výhodne sú tieto bunky T lymfocyty periférnej krvi.

DNA sekvencie predkladaného vynálezu môžu byť pripravené pomocou rôznych ciest. Je preferované, aby DNA sekvencie V

regiónov antigénnych receptorov T buniek boli pripravované pomocou polymerázovej reťazcovej reakcie (PCR) použitím DNA sekvencií kódujúcich intaktný TCR ako templáty. Ľudský V beta región môže byť pripravený napríklad cestou amplifikácie cDNA pripravenej z ľudských lymfocytov periférnej krvi stimulovaných anti-CD3 protilátkou, podľa postupu Choie et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8941-8945.

V jednom aspekte predkladaného vynálezu je získaný kompletný V región antigénneho receptora T buniek z akéhokoľvek klonu obsahujúceho kompletnú sekvenciu. Napríklad niektoré sekvencie V regiónu TCR a cDNA klony obsahujúce kompletné kódujúce regióny sú popísané Concannon et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6598-6602.

Preferované proteíny V regiónu TCR predkladaného vynálezu sú tie, ktoré sú implikované pre imunitné choroby a poruchy, konkrétne Vbeta 8.1 (Kawasakiho choroba, pozri Abe et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4066), Vbeta 6.1 (lepra, pozri Wang et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 188, Vbeta 5.1 (lymská choroba, pozri Lahesma et al., 1993, J Immunol., 150:4125), Vbeta 5.2 alebo Vbeta 5.3 alebo Vbeta 6.1 (roztrúsená skleróza, pozri Kotzin et al., 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9161), Vbeta 2.1 alebo Vbeta 3.1 (reumatoidná artritída, pozri Uematsu et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8543). (Pozri tiež Hafler, D. A. et al., 1988, J. Exp. Med., 167: 1313 a Mantagazza R. et al., 1990, Autoimmunity, 3: 431).

TCR exprimovaný klonmi T buniek pri autoimunitných chorobách alebo klonmi T buniek odpovedajúcich na jednotlivé autoantigény môžu byť identifikované použitím TCR špecifických protilátok, napríklad polyklonálnych, monoklonálnych alebo chimerických protilátok, ktoré sú špecifické pre TCR variabilné segment spolu s metódou značenia protilátok, ako je fluorescenčná mikroskopia, prietoková cytometria, imunocytochémi alebo iné techniky v obore dobre známe. Takéto protilátky sú popísané pre množstvo alfa a/alebo beta reťazcov V regiónov TCR (pozri napríklad

medzinárodná patentová publikácia WO 90/06758).

Alternatívne môže byť DNA alebo mRNA klonov T buniek označená priamo, alebo po amplifikácii PCR (Synha et al., 1988, Science, 239:1026, Saiki et al., 1986, Nature, 324: 163) a špecificky hybridizovaná próbami nukleových kyselín pre rôzne rodiny TCR génov použitím hybridizačných metód v obore dobre známych. TCR sekvencie alebo ich časti môžu byť získané priamo z amplifikovanej, rearanžovanej DNA alebo mRNA.

Expresia jednotlivých TCR môže byť tiež identifikovaná určením sekvencie nukleových kyselín kódujúcich aspoň časť TCR, napríklad po klonovaní TCR V génu, alebo určením aminokyselinovej sekvencie aspoň časti TCR proteínu. Je zrejmé, že akýkoľvek z vyššie uvedených prístupov, alebo iné prístupy v obore známe, povedie k identifikácii TCR exprimovaného na T bunkách alebo lúniách T buniek.

Príklady molekulárnych prístupov použitých na koreláciu TCR génovej expresie pri chorobách zahrnujú"

- (1) Produkciu a analýzu cDNA knižníc získaných s chorobou spojených T buniek od jedného alebo viacerých subjektov majúcich túto chorobu, aby sa určila prítomnosť frekventne používaných alebo dominantných TCR génov.
- (2) Southern analýzu vzoriek choroby na určenie špecifického génového polymorfizmu (t.j. RFLP) alebo existencie oligoklonálnych TCR prestavieb.
- (3) Analýzu vzoriek choroby cDNA pomocou syntézy, PCR amplifikácie, a slot blot hybridizácie a
- (4) In situ hybridizáciu nukleových kyselín T buniek TCR próbami bez predchádzajúcej kultivácie týchto buniek.

Preferované proteíny V regiónu TCR zahrnujú Vbeta 8.1, Vbeta 5.2 alebo Vbeta 5.3. Dvojvláknová cDNA kódujúca Vbeta 5.3 a aminokyselinová sekvencia pre Vbeta 5.3 je ukázaná na obrázku 1 (pozri SEQ ID NOS 25, 26 a 27).

Klony V regiónu antigénneho receptora T buniek môžu byť zavedené do expresných vektorov predkladaného vynálezu pomocou metód v obore dobre známych. Napríklad z cDNA klonu je V región syntetizovaný PCR inkorporovaním iniciačného ATG do 5' konca. Môže byť syntetizované akékoľvek vhodné reštrikčné miesto, ktoré inkorporuje iniciačný klon a rekonštituuje 5' kódujúci región V regiónu. V preferovanej realizácii je reštrikčným miestom NcoI miesto. Stop kodón a vhodné reštrikčné miesto sú uložené do 3' konca kódujúcej sekvencie pre V región tak, že môže byť subklonovaná do vektora.

Malo byť jasné, že metodológia tohto vynálezu môže byť použitá na prípravu kompletných V regiónov TCR odvodených od zvieracích druhov iných ako humánnych.

2. EXPRESNÉ VEKTORY

Rekombinantným expresným vektorom v rozsahu tohto vynálezu je plazmid, ktorý obsahuje exogénnu DNA vo forme nukleovej kyseliny kódujúcej V región TCR, ktorý má byť exprimovaný. Rekombinantný expresný vektor predkladaného vynálezu je vložený do buniek bakteriálneho hostiteľa napríklad pomocou transformácie a transformanty, ktoré exprimujú požadovaný proteín V regiónu, sú izolované a klonované.

Predkladaný vynález sa týka expresných vektorov obsahujúcich DNA sekvenciu kódujúcu pre kompletný proteín V regiónu TCR. Výhodne proteíny V regiónu TCR sú tie proteíny antigénnych receptorov T buniek, ktoré sú tu popísané. Expresný vektor v rozsahu tohto vynálezu je plazmid obsahujúci gény V regiónu TCR, ktoré majú byť exprimované, pod transkripčnou a translačnou kontrolou regulačných elementov, ako je napríklad promotor, väzbové miesto pre ribozómy a transkripčný terminátor. Navyše obsahuje zdroj replikácie na stabilnú replikáciu baktérie. Tiež výhodne obsahuje gény kódujúce rezistenciu na antibiotiká uľahčujúce selekciu transformovaných buniek nesúcich plazmid.

Expresia klonovaných sekvencií sa vyskytuje, ak je expresný vektor vložený do vhodnej hostiteľskej bunky.

Expresné vektory použité v predkladanom vynáleze sú často vo forme plazmidu. Plazmidy znamenajú cirkulárnu dvojvláknovú DNA sekvenciu, ktoré nie sú integrované do chromozómov. Expresné vektory predkladaného vynálezu môžu tiež obsahovať iné DNA sekvencie, ako napríklad leader alebo signálne sekvencie, ktoré sú užitočné pre zameranie alebo stabilitu expresných produktov a/alebo regulačné sekvencie, ktoré umožňujú moduláciu génovej expresie, napríklad odpoveďou na zmenu teploty alebo zmenu zloženia kultivačného média.

Expresné vektory obsahujú jednu alebo viac kontrolných sekvencií funkčne viazaných na sekvencie kódujúce V región TCR. Termín "funkčne viazaný" v rozsahu tohto vynálezu znamená, že jedna sekvencia nukleových kyselín, ktorá má regulačnú funkciu pre génovú expresiu alebo kóduje funkčnú proteínovú doménu, je kovalentne viazaná na buď 3' alebo 5' k druhej sekvencii nukleových kyselín kódujúcich proteín tak, že regulačná funkcia použitá na druhú sekvenciu nukleových kyselín alebo kódovaných funkčných domén bude fuzionovaná do rámčeka k proteínu kódovanému druhou nukleovou kyselinou. Takéto regulačné funkcie pre génovú expresiu obvykle zahŕňujú iniciáciu transkripcie, termináciu transkripcie a spracovanie mRNA transkriptu. Sekvencie nukleových kyselín, ktoré vykazujú takéto regulačné funkcie na génovú expresiu, zahŕňujú promotory transkripcie, transkripčné terminátory a signály mRNA spracovania. Funkčné domény, ktoré môžu byť funkčne viazané na iné proteíny zahŕňujú napríklad leader alebo signálne peptidy, ktoré dovoľujú transport proteínov cez bunkovú membránu.

V jednej realizácii môže byť promotorom indukovateľný promotor. V preferovanej realizácii je promotor taký, že môže byť regulovaný prítomnosťou alebo absenciou istých komponentov média. V obore skúšania je poznateľné, že niektoré bakteriálne promotorové subjekty na kontrolu prítomnosti alebo absencie

istých komponentov média, môžu byť použité v spojení s expresnými vektormi predkladaného vynálezu. Je preferované, aby promotorom bol silný bakteriálny promotor, ako je lac promotor, tac promotor a trc promotor. Preto v jednej realizácii je vo vektore tohto vynálezu promotorom pre kódujúcu sekvenciu V regiónu TCR subjekt regulovaný prítomnosťou alebo absenciou izopropyl-beta-D-tiagalaktopyranozid (IPTG), spontánna chemická induktorová molekula lac, tac a trc promotorov. V referovanom aspekte je IPTG-indukovateľný promotor lac promotor alebo tac promotor. V preferovanejšej realizácii je IPTG-indukovateľný promotor trc promotor (Brosius et al., 1985, J. Biol. Chem., 260: 3539-3541), ktorý je podobný tac promotoru, derivovanému pomocou fúzie 10-regiónu lac UV5 promotora s -35 regiónu tryptofánového eporónu (de Boer et al., 1983, Proc. Natl. Sci. USA 80: 21-25, Amann et al., 1983, Genen, 25: 167-178). Trc promotor je zhodný s tac promotorom s výnimkou jedného páru v promotore (Brosius et al., (1985) supra).

V ďalšej realizácii je expresný vektor predkladaného vynálezu modifikovaný tak, aby umožňoval sekrečnú expresiu kompletného proteínu V regiónu TCR vynálezu teplotným posunom. Podľa tejto realizácie umožňuje expresný vektor expresiu proteínu V regiónu TCR pri absencii chemických induktorov, čo vylučuje použitie takýchto elementov ako je IPTG a reťazca bakteriálneho hostiteľa s obsahom lacI alebo lacI^q gény. Preferované realizácie expresných vektorov predkladaného vynálezu zahrnujú regulačné gény, ktoré umožňujú termálnu expresiu. Regulačná génová sekvencia je najlepšie lacIts gén, ktorý kóduje teplotne senzitívny lac represor.

V ďalšej preferovanej realizácii je lacIts gén lokalizovaný proximálne od a po reťazci od transkripčného terminátora a transkripčný smer je rovnaký ako pre kódujúcu sekvenciu V regiónu.

Navyše expresné plazmidy tohto vynálezu výhodne obsahujú jeden alebo viac selektovateľných markérov. Výhodne vedie

selektovateľný genetický markér k rezistencii na antibiotiká ako je ampicilín, kanamycín alebo tetracyklín. Najvýhodnejšie je selektovateľný markér gén rezistencie na tetracyklín.

Ďalej vektory obsahujú bakteriálny zdroj replikácie. V preferovanej realizácii je zdroj replikácie odvodený od pBR322. Expresný vektor tiež obsahuje väzbové miesto pre ribozómy a transkripčný terminátor *rrnB* ribozomálneho RNA operónu *E. coli* (Brosius et al., Plazmid, 6: 112-118).

V preferovanej realizácii expresný vektor predkladaného vynálezu obsahuje ako základné elementy v 5'-3' smere: DNA sekvenciu, ktorá obsahuje promotor a operátor, DNA sekvenciu, ktorá obsahuje väzbové miesto pre ribozómy pre predloženie mRNA požadovaného génu schopného väzby na ribozómy v hostiteľskej bunke, ATG iniciačný kodón alebo DNA sekvenciu, ktorá je konvertovaná do ATG iniciačného kodónu po insercii požadovaného génu do vektora, reštrikčné miesto pre inserciu požadovaného génu v rámci s ATG iniciačným kodónom alebo multiplikované miesto obsahujúce niekoľko reštrikčných miest pre inserciu vhodného génu alebo kódujúceho regiónu, ktorý má byť exprimovaný, sekvenciu nukleových kyselín kódujúcu sekvenciu V regiónu antigénneho receptora T buniek, ktorá má byť exprimovaná a transkripčný terminátor, ktorý slúži na účinné ukončenie transkripcie. Vektor tiež obsahuje DNA sekvencie, ktoré obsahujú zdroj replikácie z bakteriálneho plazmidu schopného uskutočniť autonómnú replikáciu v hostiteľských bunkách a DNA sekvencie, ktoré obsahujú gény asociované so selektovateľnými alebo identifikovateľnými fenotypickými črtami, ktoré sa manifestujú, ak je vektor prítomný v hostiteľovi. Expresný vektor môže voliteľne obsahovať signálny alebo leader kódujúce sekvencie funkčne viazané, t.j. fuzionované v rámci, na 5' koniec sekvencie nukleových kyselín kódujúci V región TCR tak, že translácia leader sekvencie-TCR V región sekvencie vedie k leader peptid-V región TCR fuzionovanému proteínu, v ktorom leader peptid na amino konci fuzionovaného proteínu riadi sekréciu proteínu V regiónu TCR cez membránu hostiteľskej bunky. V istej preferovanej realizácii obsahuje

expresný vektor regulačný gén pre expresiu sekrétovaného proteínu teplotným posunom.

V preferovanejšej realizácii obsahuje expresný vektor nasledujúce základné elementy v 5'-3' smere: trc promotor, ktorý je zložený z -10 regiónu lac UV 5 promotora fuzionovanému s -35 regiónom tryptofánového operónu (de Boer et al., supra, Amann et al. (1983) supra), silné ribozóm viažúce miesto, kódujúce región V regiónu TCR, ktorý má byť exprimovaný, dva transkripčné terminátory z rrnB ribozomálneho RNA operónu, lacIts gén kódujúci pre teplotne senzitívny lac represor, pBR32 zdroj replikácie a gén rezistencie pre tetracyklín. Príklad takejto preferovanej realizácie, expresný vektor pKBi-Vbeta 5.3 bol uložený podľa Budapeštianskej zmluvy v American Type Culture Collection (ATCC) pod prírastkovým číslom 69739 6. januára 1995.

Expresné vektory predkladaného vynálezu môžu obsahovať leader sekvencie kódujúce signálne peptidy funkčne viazané na 5' kódujúci región V regiónu TCR. V expresii bude riadiť amino terminálny koncový peptid sekréciu proteínu V regiónu TCR cez membránu hostiteľskej bunky, do periplazmy kultivačného média. Odborník pozná, že množstvo leader sekvencií môže byť použité v spojení s expresným vektorom predkladaného vynálezu. Vhodnú leader sekvenciou je pelB signálna sekvencia z *E. carotovora* (Lei et al., 1987, J. Bacteriology, 169: 4379-4383). Iná vhodná leader sekvencia je termostabilný enterotoxín II (ST II) signálnej sekvencie *E. coli* (Morioka-Fujimoto et al., 1991, Biol. Chem., 266: 1728.1732).

V jednej realizácii obsahuje expresný systém STII leader sekvenciu a kódujúci región pre V región je PCR syntetizovaný tak, aby obsahoval vhodné reštrikčné miesto v 3' konci a spracované MluI miesto na 5' konci a tak môže vhodne viazať MluI miesto inkorporované do 3' konca STII leadera. Preto v ďalšej preferovanej realizácii obsahuje expresný vektor v smere 5'-3' :trc promotor, ktorý sa skladá z -10 regiónu lac UV 5 promotora fuzionovanému s -35 regiónom tryptofánovaného operónu, silné

ribozóm viažúce miesto, STII leader, kódujúci región V regiónu antigénneho receptora T buniek, ktorá má byť exprivovaný, transkripčný terminátor z *rrnB* operónu, *lacIts* gén kódujúci teplotne senzitivný *lac* represor, pBR322 zdroj replikácie a gén rezistencie pre tetracyklín. V najpreferovanejšej realizácii je vektorom pKB-Vbeta5.3.

Expresný vektor predkladaného vynálezu môže byť konštruovaný použitím štandardných techník známych v obore (pozri Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982).

Predkladaný vynález sa navyše zaoberá hostiteľskými bunkami obsahujúcimi expresný vektor, ktorý obsahuje DNA sekvenciu pre kompletný V región TCR. Navyše, preferované hostiteľské bunky obsahujú expresný vektor, zahrnujúci jednu alebo viac kontrolných DNA sekvencií schopných priamej replikácie alebo expresie DNA sekvencie kódujúcej pre kompletný proteín V regiónu antigénneho receptora T buniek. Vhodné hostiteľské bunky zahrnujú prokaryotické hostiteľské bunky, v preferovanej realizácii sú prokaryotické hostiteľské bunky bakteriálne hostiteľské bunky, najlepšie *E. coli* bunky. Odborníci pochopia z okamžitej aplikácie, že použitie jednotlivých expresných vektorov ovplyvní výber hostiteľských kmeňov vybraných pre produkciu s cieľom kódovania pre kompletných proteínov V regiónu TCR. Napríklad expresné vektory podrobené chemickej indukcii v rozsahu tohto vynálezu, bakteriálne hostiteľské kmene, ktoré nie sú *lacI* alebo *lacI^q* gén, ktorý reguluje *trc* promotor, sú predovšetkým využívané. V expresných vektoroch v rozsahu tohto vynálezu sú preferované také, ktoré obsahujú génové regulačné sekvencie ako *lacIts* gén, ktorý poskytuje teplotne senzitivný represor a tiež bakteriálne hostiteľské kmene, ktoré nenesú divoký typ *lacI* alebo *lacI^q* gény. Predovšetkým je preferovaná hostiteľská bunka LJ24.

V istej realizácii neobsahuje expresný vektor predkladaného vynálezu leader sekvenciu. V istej preferovanej realizácii je bakteriálny hostiteľský kmeň *E. coli* BL21, alebo lepšie proteáza

deficientnej E. coli kmene, ako je SG21163, SG22094, SG21173.

Expresný vektor predkladaného vynálezu môžu byť zavedené do hostiteľských buniek pomocou rôznych metód známych v obore, ktoré sa môžu meniť v závislosti od typu celulárneho hostiteľa. Napríklad, pôsobenie chloridu vápenatého alebo elektroporácie sú všeobecne používané pre prokaryotické bunky (pozri všeobecne Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982)).

Keď bol exprimovaný vektor raz vložený do vhodnej hostiteľskej bunky, hostiteľská bunka môže byť kultivovaná pri podmienkach dovoľujúcich expresiu značného množstva V regiónu TCR.

Hostiteľská bunka obsahujúca expresný vektor, ktorý obsahuje DNA sekvenciu kódujúcu pre proteíny V regiónu TCR môže byť identifikovaná pomocou akejkoľvek vhodnej metódy. V nasledujúcich príkladoch, napríklad, je produkcia proteínov V regiónu TCR detegovaná imunologicky použitím imunoskúšky. Alternatívne hostiteľská bunka obsahujúca expresný vektor predkladaného vynálezu môže byť identifikovaná hodnotením hladiny transkripcie DNA V regiónu TCR meraním špecifických transkriptov V regiónu TCR v hostiteľskej bunke (t.j. northern blot analýza). V ešte ďalšej metóde môže byť hostiteľská bunka obsahujúca expresné vektory predkladaného vynálezu identifikovaná pomocou DNA-DNA hybridizácie použitím prôb komplementárnych ku kódujúcim sekvenciám V regiónu TCR vektora.

DNA sekvencie predkladaného vynálezu, expresné vektory alebo DNA molekuly môžu byť určené pomocou rôznych metód známych v obore. Napríklad pomocou dideoxydovej reťazcovej metódy ako ju popisuje Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.

Nasledujúce príklady poskytujú a používajú jednu alebo viac detekčných metód popísaných vyššie, odborníci môžu, bez

prehnaného experimentovania ľahko vybrať kombinácie expresných vektorov a hostiteľských buniek, ktoré poskytujú optimálnu expresiu proteínov V regiónu TCR. Kombinácie jednotlivého hostiteľského kmeňa s jednotlivým expresným vektorom tohto vynálezu je možné získať relatívne vysokú úroveň expresie kompletného proteínu receptora T bunky. Výhodne je úroveň expresie kompletného proteínu V regiónu TCR aspoň 300 mg na liter kultúry. Takéto hladiny môžu byť získané napríklad použitím preferovanej realizácie v ktorej je *E. coli* SG21173 bakteriálnym hostiteľským kmeňom a pKBi-Vbeta5.3 expresným vektorom (pozri príklady, infra). Takéto kombinácie hostiteľov a expresných vektorov tohto vynálezu dovoľujú produkciu signifikantnej kvantity kompletného proteínu V regiónu TCR pri menších nákladoch, ako bolo predtým možné.

Hneď ako sú exprimované, môžu byť proteíny vynálezu purifikované v súlade so štandardnými procedúrami, vrátane precipitácie amóniumsulfátom, afinitou chromatografiou, kolónovou chromatografiou, gélovou elektroforézou a pod. (pozri všeobecne Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, NY (1982)).

V preferovanej realizácii je V región antigénneho receptora T bunky solubilný. Tým je myslené, že V región antigénneho receptora T bunky je solubilný vo vodnom systéme. "Solubilný" proteín je všeobecne charakterizovaný zlyhaním sedimentácie pri izbovej teplote pri vysokej G-sile centrifugácie (100 000 x g) z vodného pufra. Solubilita je predovšetkým dôležitá pre zjednodušenie purifikácie. V región antigénneho receptora T bunky z produkujúcich buniek. Vodné pufre použité v proteínovej chémii typicky majú pufrovacu zložninu na udržanie určitého pH (typicky v medziach fyziologického rozmedzia okolo pH 5-9), poskytujú jednotlivé ionizované reťazce (typicky medzi asi 10 až 500 mM) a často zahrnujú proteázový inhibítor a stredný detergent. Príkladom štandardných pufrov je fosfátová pufrovaná soľ, Tris-pufrovaná soľ a množstvo pufrov používaných na izoláciu proteínu (pozri všeobecne, Methods in Enzymology, Mahlers and

Cordes Biological Chemistry (II. vyd), Harper and Row, New York (1966)).

3. POUŽITIE PROTEÍNOV ANTIGÉNNEHO RECEPTORA T BUNKY

Predkladaný vynález poskytuje prvý krát prostriedky na dostatočnú a ekonomickú produkciu diagnosticky, terapeuticky a vedecky užitočného množstva proteínov V regiónu TCR, ktorý nie je fúznym proteínom ani nie je naviazaný na cudzie sekvencie, ako sú afinitné konččky.

A. Použitie vo výskume a diagnostike

Proteíny V regiónu TCR predkladaného vynálezu sú využiteľné v štrukturálnych a funkčných štúdiách antigénneho receptora T buniek (TCR). Okrem ponuky substrátu alebo väzbovej domény pre špecifické formy TCR môžu tieto proteíny slúžiť ako prostriedky pre konformačné štúdie, t.j. na priblíženie natívnej konformácie rôznych častí receptora T buniek.

Proteíny V regiónu T buniek môžu tiež byť použité ako diagnostické próby. V jednej preferovanej realizácii môžu byť proteíny V regiónu TCR predkladaného vynálezu použité na určenie množstva alebo prítomnosti istých podrodín V regiónu TCR v biologickej vzorky. Jedna takáto skúška je popísaná Ritterhausom, C. W. v International Patent Publication WO 92/08981 pod názvom "Therapeutic and Diagnostic Methods Using Total Leukocyte Surface Antigens". Predkladaný vynález poskytuje metódy pre diagnózu imunitných chorôb ako je napríklad roztrúsená skleróza, pomocou detekcie špecifických podskupín T buniek asociovaných s chorobou.

V inej realizácii môže byť predkladaný vynález použitý na generáciu signifikantného množstva proteínov V regiónu antigénneho receptora T buniek pre použitie v produkcii protilátok. Protilátky môžu byť pripravené použitím mnohých techník v obore známych. S cieľom produkcie monoklonálnych protilátok (MAb) môže byť použitá akákoľvek metóda, ktorá

poskytuje produkciu protilátkovej molekuly kontinuálnymi bunkovými líniami v kultúre. Táto metóda zahrnuje, ale nie je tým obmedzená, hybridizačné techniky originálne popísané Kohlerom a Milsteinom, 1975, *Nature*, 256: 495-497), novšie hybridizačné techniky ľudských B buniek (Kozbor et al., 1983, *Immunol. Today*, 4: 72, EBV techniky (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., stránky 77-96 (1985) a traumatické techniky. Ako prehľad metód produkcie protilátok pozri: Hartlaw, E., et al., *Antibodies: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988).

Proteíny V regiónu TCR vynálezu môžu byť využité ako diagnostické próby vzhľadom na ich schopnosti reagovať s autoprotilátkami v biologických vzorcoch.

Predkladaný vynález tiež predkladá značené deriváty proteínov V regiónu TCR, ktoré môžu byť detegované vhodnými monotormi, ako je scintilačná Geigrova komôrka, alebo rádiografický film. Takéto deriváty zahŕňujú napr. ^{125}I , ^{131}I , ^{14}C , ^{35}S , ^3H , ^{112}In , ^{99}mTc a podobne na in vitro a in vivo diagnostické účely.

B. TERAPEUTICKÉ VYUŽITIE

Ako bolo uvedené vyššie, tento vynález je spojený s imunitnými chorobami.

Termín "imunitné choroby" tu označuje choroby, v ktorých je imunitný systém zapojený do patogenézy choroby, alebo v ktorých vhodná stimulácia imunitného systému môže viesť k ochrane pred chorobou. Relevantné choroby zahŕňujú, ale nie sú nimi obmedzené, autoimunitné choroby, neoplastické choroby, infekčné choroby, hypersenzitivitu, transplantáciu, reakciu štepú proti hostiteľovi a degeneratívne choroby nervového systému. Autoimunitné choroby zahŕňujú, ale nie sú nimi obmedzené, artritídu, ako je napr. reumatoidná artritída, I typ diabetes, juvenilná diabetes, rozstrúsenú sklerózu, autoimunitnú

tyreoiditídu (Hashimotovú tyreoiditídu), myasteniu gravis, systémový lupus erytematodes (SLE), Sjogrenov syndróm, Gravesovu chorobu, Adisonovú chorobu, Goodpasteurov syndróm, sklerodermiu, dermatomyositídu, myxedém, polymyositídu, perniciosnú anémiu, zápalové črevné choroby vrátane Crohnovej choroby a autoimunitné atrofické gastritídy a autoimunitnú hemolytickú anémiu. Neoplastické choroby zahrnujú, ale nie sú nimi obmedzené, lymfoproliferatívne choroby, ako je leukémia, lymfómy, Non-Hodgkinské lymfómy a Hodgkinské lymfómy a karcinómy, ako je napr. karcinóm prsníka, tlstého čreva, pľúc, pečene, pankreasu, melanóm, karcinóm ľadvín, atď. Infekčné choroby zahrnujú, ale nie sú nimi obmedzené, vírusové infekcie spôsobené vírusmi, ako je HIV, HSV, EBV, CMV, Influenza, Hepatitis, A, B alebo C, mykotické infekcie, ako sú napr. tie, ktoré sú spôsobené kvasinkami rodu *Candida*, parazitárne infekcie ako sú napr. tie, ktoré spôsobuje schistosoma, filarie, nematoda, trichinela alebo protozoa ako trypanozómy spôsobujúce spavú chorobu, plazmodium spôsobujúce maláriu alebo leishmanie spôsobujúce leishmaniózu a bakteriálne infekcie ako napríklad tie, ktoré spôsobujú mykobaktérie, corynobaktérie alebo stafylokokus. Hypersenzitívne choroby zahrnujú, ale nie sú nimi obmedzené, Typ I hypersenzitivity, ako je napríklad kontakt s alergénom, ktorý vedie k alergii, Typ II hypersenzitivity, ako je napríklad pri Goodpasteurovom syndróme a myasténii gravis.

Terapeutické použitie proteínov V regiónu TCR tohto vynálezu je založené na korelácii medzi špecifickými imunitnými chorobami a preferenčnou expresiou určitého proteínu V regiónu bunkového receptora T buniek alebo určitej sekvencie kódujúcej proteín V regiónu TCR. Aj keď by predkladaný vynález nemal byť limitovaný určitou vedeckou teóriou, V regióny TCR sú užitočné čiastočne preto, že môžu byť užitočné pri regulácii imunitnej odpovede pre jednotlivcov. Špecificky tam, kde prítomnosť alebo abnormálne vysoká expresia jednotlivého V regiónu koreluje s jednotlivou imunitnou chorobou, sa dá liečiť jednotliviec neutralizáciou T buniek nesúcich určitý proteín V regiónu. Navyše zavedenie proteínu V regiónu TCR môže ovplyvniť imunisupresívne funkcie

stimuláciou regulačných T buniek, ktoré budú špecificky reagovať s T bunkami nesúcimi cieľový T región. Je tiež pravdepodobné, že proteíny V regiónu TCR môžu zvyšovať protilátkovú odpoveď, ktorá bude špecificky interagovať s cieľovým regiónom na T bunkách a spätne regulovať imunitnú odpoveď.

Kompletné proteíny V regiónu antigénneho receptora T buniek predkladaného vynálezu poskytujú jasné výhody v liečbe imunitných chorôb. Pred predkladaným vynálezom zahrnovali terapeutické možnosti imunitných chorôb súvisiacich so špecifickými T bunkami (a) žiadnu liečbu s možným spontánnym vyliečením, (b) liečbu peptidmi korešpondujúcimi s jednotlivými segmentmi V regiónu antigénneho receptora T buniek, (c) nešpecifickú liečbu, ako je napr. liečba steroidmi alebo nesteroidnými protizápalovými prostriedkami. Avšak žiadny z týchto prístupov nedovoľuje výhody predkladaného vynálezu. Terapeutické metódy predkladaného vynálezu majú jasné výhody oproti predchádzajúcim metódam liečby imunitných chorôb v tom, že metódy predkladaného vynálezu sú zamerané len na jednotlivú podskupinu T buniek nesúcu určitý V región a môžu byť použité pre rôzny rozsah postihnutých jedincov, keďže vynález umožňuje elimináciu potreby selektovať jednotlivé peptidy vzťahnuté na MHC haplotypy jednotlivých indivídií. Metóda predkladaného vynálezu sa tesnejšie približuje cieľu modulácie len tých T buniek, ktoré majú vzťah k chorobe a ušetrenia alebo neovplyvnenia iných T buniek subjektu. Vynález tak dosahuje vyššiu špecifickosť terapie medzi širšou populáciou.

V preferovanej realizácii môže byť kompletný proteín V regiónu antigénneho receptora T buniek použitý na down-reguláciu alebo elimináciu podskupín T buniek, ktoré vykazujú TCR nkorporujúce rovnaké V regióny. Proteíny V regiónu antigénneho receptora T buniek môžu byť použité v terapeutických situáciách na modulovanie aktivity týchto T buniek, ktoré nesú cieľový V región alebo indukovanie neodpovedavosti v populácii aktívne odpovedajúcich T buniek nesúcich cieľový V región. V tejto situácii je antigénny receptor T buniek použitý ako terapeutická kompozícia v subjekte.

Špecifické proteíny V regiónu antigénneho receptora T buniek asociované s danou chorobou sú identifikované pomocou akejkoľvek z množstva techník v obore dobre známych. Genetický prístup s použitím pacientov s myasténiou gravis alebo roztrúsenou sklerózou bol popísaný Oksenbergom, J. R. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 988-992.

Termínom liečba v predkladanom vynáleze sa rozumie "prevencia", "supresia" alebo "liečba" choroby. "Prevencia" zahrnuje podanie protektívnej kompozície pred vznikom choroby. Tak napríklad pokiaľ ide o zvierací model experimentálnej autoimunitnej encefalomyelitídy (EAE), úspešné podanie protektívnej kompozície pred podaním encefalitogénu, ktorý indukuje chorobu, vedie k "prevencii" choroby.

"Supresia" zahrnuje podanie kompozície po indukcii, ale pred klinickou aparenciou choroby. Tak napríklad pri použití EAE príkladu, úspešné podanie protektívnej kompozície po injekcii encefalitogénu, ale pred neurologickými symptómami, vedie k "supresii" choroby.

"Liečba" zahrnuje podanie protektívnej kompozície po objavení sa choroby. Na príklade EAE, úspešné podanie protektívnej kompozície po injekcii encefalitogénu a po klinických príznakoch vedie k "liečbe" choroby.

Na meranie preventívneho, supresívneho a terapeutického benefitu proteínu V regiónu TCR predkladaného vynálezu boli merané isté klinické výsledky. Predovšetkým boli merané alterácie proliferatívnej odpovede lymfocytov in vitro. Skúšky na meranie terapeutického benefitu jednotlivých proteínov V regiónu sú v obore známe.

Zvieracie modelové systémy, ktoré môžu byť použité na screening efektivity proteínov pri protekcii alebo liečbe sú dosiahnuteľné. Systémový lupus erytematodes (SLE) je testovaný na

susceptibilných myšiach ako popisuje Knight et al., 1978, J. Exp. Med., 147: 1653 a Reinersten et al., 1978, 299: 515. Myasténia gravis (MG) je testovaná na SJL/J myšacích samiciach pomocou indukcie choroby solubilným AChR proteínom z iných druhov, popis: Lindstrom et al., 1988, Adv. Immunol., 42: 233-284. Artritis je indukovaná na vnímavom kmeni myši injekciou II typu kolagénu: Stuart et al., 1984, Ann. Rev. Immunol., 42: 233-284. Adjuvantná artritída je indukovaná vnímavým potkanom injekciou Mykobakteriálneho proteínu tepelného šoku ako popisuje Van Edan et al., 1988, Nature, 331: 171-173. Tyreoiditída je indukovaná myšiam podaním tyreoglobulínu ako popisuje Maro et al., 1980, 152: 1115-1120. Inzulín dependentná diabetes mellitus (IDDM) sa vyskytuje prirodzene alebo môže byť indukovaná pokiaľ ide o isté kmene myši, ako sú tie, ktoré popísal Kanasawa et al., (1984). EAE, pokiaľ ide o myši a potkany, poskytuje model pre MS ľudí. V tomto modeli je demyelinizačná choroba indukovaná podaním myalínbázického proteínu (MBP), ako popisuje Paterson, P. Y., Textbook of Immunopathology (Mischer et al., eds.), Grune and Stratton, New York, str. 179-213 (1986), McFarlin, D. E. et al., 1973, Science, 179: 478-480 a Satoh, J. et al., 1987, J. Immunol., 138: 179-184.

Samozrejme, identické proteíny nemusia byť účinné pre ľudí, pretože nemusia korešpondovať s vhodnými miestami na ľudskom s chorobou asociovanom TCR. Je zrozumiteľné, že môže byť požadovaná taká modifikácia proteínovej sekvencie určenej na zvieraťom modeli, aby liečila subjekty patriace k inému druhu vrátane ľudí.

4. FARMACEUTICKÉ KOMPOZÍCIE OBSAHUJÚCE V REGIÓN ANTIGÉNNEHO RECEPTORA T BUNIEK

Proteíny a kompozície predkladaného vynálezu, alebo ich funkčné deriváty, sú vhodné na prípravu farmaceutických kompozícií. Farmaceutické kompozície predkladaného vynálezu môžu byť podané akýmkoľvek zvieratám, u ktorých sú skúsenosti s benefičnými efektmi kompozície vynálezu. Najprednostnejšími medzi takýmito živočíchmi sú ľudia, aj keď vynález nemá v úmysle byť

tak obmedzený.

Farmaceutické kompozície predkladaného vynálezu môžu byť podávané pomocou akýchkoľvek prostriedkov, ktoré dosahujú zamýšľaný cieľ. Podanie môže byť napríklad parenterálne, subkutánne, intravenózne, intradermálne, intramuskulárne, intraperitoneálne, transdermálne alebo bukálne. Alternatívne, alebo konkurenčne, môže byť podanie cestou orálnou.

Proteíny a farmaceutické kompozície môžu byť podané parenterálne bolusovou injekciou alebo graduálnou perfúziou časom.

Podaná dávka bude závisieť od veku, pohlavia, zdravotného stavu a váhy recipienta, typu konkurenčnej liečby, ak je dajaká, frekvenčnej liečby a povahy požadovaného efektu. Dávkové rozsahy podania kompozícií predkladaného vynálezu sú dostatočné množstvá umožňujúce produkciu požadovaného efektu, čím je napríklad dosiahnutá imunitná odpoveď na proteíny meraná oddialenou hypersenzitivitou (DTH) alebo produkciou protilátok a signifikantnou prevenciou, supresiou alebo liečbou imunitnej choroby. Dávky by nemali byť príliš vysoké, aby nespôsobovali vedľajšie účinky, ako je nežiadúce skrížená reakcia, generalizovaná imunosupresia, anafylaktická reakcia a pod.

Preferované dávky pre ľudí sú v rozsahu 0,001-1 mg/kg telesnej hmotnosti.

Navyše k proteínom predkladaného vynálezu, ktoré sú samé sebe farmaceuticky aktívne, môžu farmaceutické kompozície obsahovať vhodný farmaceuticky akceptovateľný nosič obsahujúci excipienty a auxiliária, ktoré uľahčujú spracovanie aktívnej zlúčeniny do preparátov, ktoré môžu byť použité farmaceuticky. Preferované zlúčeniny zahrnujú inkluzívne prostriedky, ako je oxid hlinitý, alebo iné prostriedky v obore známe (pozri napr. Warren et al., 1986, Ann. Rev. Immunol., 4: 369-388, Chedid, L., 1986, Feder. Proc., 45: 2531-2560).

Aby sa zvýšila dostupnosť alebo bioaktivita, môžu byť proteíny inkorporované do lipozómov použitím metód a zlúčenín v obore známych.

Prípravky, ktoré môžu byť podané orálne vo forme tabliet a kapsuliek, prípravky, ktoré môžu byť podané rektálne, ako sú čapíky a prípravky vo forme roztokov pre injekcie alebo orálne podanie obsahujú 0,001 až 99 %, lepšie od 0,01 do 95 % aktívnej zlúčeniny, spoločne s excipientom.

Vhodné excipienty sú predovšetkým plnivé, ako sú sacharidy, napríklad laktóza alebo cukróza, manitol alebo sorbitol, elulózové prípravky a/alebo fosforečnan vápenatý, napríklad triklaciumfosfát alebo hydrogenfosforečnan vápenatý, rovnako ako spojivá ako je škrobová pasta, použitím napríklad kukuričného škrobu, ryžového škrobu, zemiakového škrobu, želatíny, tragantu, metylcelulózy, hydroxypropylmetylcelulózy, karboxymetylcelulózy sodnej a/alebo polyvinylpyrolidónu.

Ďalšie farmaceutické preparáty, ktoré môžu byť použité orálne zahŕňujú zasúvacie plniace kapsulky vyrobené zo želatíny, rovnako ako mäkké, uzatvárateľné kapsulky vyrobené zo želatíny a plasticizéry, ako je napríklad glycerol alebo sorbitol. Zasúvacie plniace kapsulky môžu obsahovať aktívnu zlúčeninu vo forme granúl, ktoré môžu byť zmiešané s plnivami, ako je laktóza, spojivá, ako je škrob a/alebo lumbrikanty, ako je napríklad mastenec alebo stearát horečnatý a poprípadе stabilizátory. V mäkkých kapsulkách je aktívna zlúčenina preferovane rozpustená alebo suspendovaná vo vhodnej tekutine, ako sú masťné oleje alebo tekutý parafín. Navyše môže byť pridaný stabilizátor.

Možné farmaceutické kompozície, ktoré môžu byť použité rektálne, napríklad čapíky, ktoré sú zložené z kombinácie jednej či viacerých aktívnych zlúčenín a čapíkovej bázy. Vhodné čapíkové bázy sú napríklad prírodné alebo syntetické triglyceridy alebo parafínové uhľovodíky.

Navyše je tiež možné použiť želatínové rektálne kapsulky, ktoré sú zložené z kombinácie aktívnej zlúčeniny s bázou. Možné materiály pre bázu sú napríklad tekuté triglyceridy, polyetylénglykol alebo parafínové uhľovodíky.

Vhodné prípravky pri parenterálnom použití zahrnujú vodné roztoky proteínu vo forme rozpustnej vo vode, napríklad vo forme solí vo vode rozpustných. Navyše suspenzia proteínov môže byť podaná ako injekcia vhodnej olejovej suspenzie. Vhodné lipofilné rozpúšťadlá alebo vehikulá zahrnujú mastné oleje, napríklad sezamový olej, alebo syntetické estery mastných kyselín, napríklad etyloléat alebo triglyceridy. Vodné injekčné suspenzie obsahujú substancie, ktoré zvyšujú viskozitu suspenzie, ako je napríklad karboxymetylcelulóza sodná, sorbitol a/alebo dextrán. Voliteľne môže suspenzia tiež obsahovať stabilizátory.

Proteíny sú pripravené použitím konvenčne farmaceuticky prijateľných vehikúl pre injekčné podania. Tieto vehikulá sú netoxické a terapeutické a množstvo formulácií je dané v Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E. W., ed.) Mack Publishing Co. Easton, PA (1990). Nelimitujúcim príkladom excipientov je voda, salinický roztok, Ringrov roztok, roztok dextrózy a Hankov vyvážený roztok. Formulácie podľa vynálezu môžu tiež obsahovať malé množstvo aditív, ako sú substancie udržiavajúce izotonicitu, fyziologické pH a stabilitu.

Proteíny podľa vynálezu sú preferovane formulované v purifikovanej forme, predovšetkým bez obsahu agregátov a iného proteínového materiálu, preferovane v koncentrácii od 0,1 ng/ml do 100 mg/ml.

Účinné dávky proteínov tohto vynálezu pri použití pri prevencii, supresii alebo terapii imunitných chorôb, ležia v rozmedzí od 1 ng do 100 mg/kg telesnej hmotnosti. Preferované rozmedzie dávky je od 10 ng do 10 mg/kg telesnej hmotnosti. Ešte preferovanejšie rozmedzie dávky je od 100 ng do 1 mg/kg telesnej

hmotnosti.

Metódy na zvýšenie účinnosti proteínov sú v obore známe. Tieto techniky môžu byť použité v konjunkcii s proteínmi predkladaného vynálezu.

Nasledujúce príklady sú ponúknuté na ilustráciu, ale nie sú limitujúce.

Príklady realizácie vynálezu

Nasledujúce všeobecné techniky sú použité v celých nasledujúcich príkladoch.

1. Materiál a metódy všeobecne

A. Baktérie, plazmidy a všeobecné metódy

Escherichia coli GM 2929, metyláza negatívna a *E. coli* LJ 24 (lac delécia) (Rasmussen et al., 1991, J. Bacteriology, 173: 6390-6397) boli darované Dr. Martinom Marinusom, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, *E. coli* JM 109 (Yanisch - Peron et al., 1985, Gene, 33: 103-119) boli získané od Promega Corporation, Madison, WI (USA). BL21 (lon, ompT) (Wood, W. B. M., 1966, J. Mol. Biol. 16: 118-133, Studier and Moffatt, 1986, J. Mol. Biol., 189: 113-130) boli získané od Novagen, Madison, WI (USA). SG 22094 (lon, clp), SG 21163 (lon, htrp) a SG 21173 (lon, htrp, clp) boli darované Dr. Susan Gottesmanovou, National Institutes of Health, Bethesda, MD (USA). Tieto Gottesmanovej kmene mali deléciu lacI génu. Baktérie boli vytvorené kompetentné pre transformáciu Morrisonovou metódou 1979, Meth. Enzymology, 68: 326-331, alebo boli získané (DH5 alfa) od Gibco BRL, Gaithersburg, MD (USA).

pKK233-2 (Amann a Brosius, 1985, Gene, 40: 183-190) bol získaný od Pharmacia, Piscataway, NJ (USA). pBR322 (Bolivar et al., 1977, Gene, 2: 95-113) bol získaný od New England Biolabs,

Beverly, MA (USA). pBluescript II KS+ (Alting-Mees et al., 1992, Meth. Enzymology, 216: 483-495) bol získaný od Stratagene, La Jolla, CA (USA). pDC952 obsahujúci *argU(dnaY)* gén (Lindsey et al., 1989, J. Bacteriology, 171: 6197-6250) bol darovaný Dr. Jamesom R. Walkerom, University of Texas, Austin, TX. pSE 420 (Brosius, 1992, Meth. Enzymology, 216: 462-483) a pKK480-3 (Brosius, (1992) supra) daroval Dr. Jurgen Brosius, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY. pUCts (Bukrinsky et al., 1989, Gene, 70: 415-417) bol získaný od Miachaila I. Burkinského cez Jurgena Brosiusa.

Plazmidové konštrukcie boli získané pomocou štandardných procedúr (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)). DNA reštrikčné a modifikačné enzýmy boli získané od New England Biolabs, ak nie je uvedené niečo iné a boli použité podľa špecifického výrobcu. Syntetické oligonukleotidy boli získané od Operon Technologies, Inc., Alameda, CA (USA), ak nie je uvedené niečo iné. Oligonukleotidy boli tepelne spracované zmiešaním ekvimolárnych koncentrácií komplementárnych oligonukleotidov v 10 mM Tris pH 8.0, 5 mM $MgCl_2$ a umiestené v 100 °C na 5 minút a potom pomaly ochladzované na 25 °C. Polymerázová reťazcová reakcia (PCR) bola uskutočnená (Saiki et al., 1988, Science, 239: 487-491) v zariadení Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cykler, použitím Gene Amp reagent kitu (The Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT (USA)). DNA sekvenovanie využíva didexonukleotidovú reťazcovú terminačnú metódu (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467) použitím Sequenase kitu (U.S. Biochemical, Cleveland, OH (USA)). Všetky chemické reagens mali najvyššiu dosiahnutú čistotu.

B. Rast a indukcia bunkových kultúr

Pre chemicky indukované kultúry boli použité zmrazené glycerylové živné roztoky na inokulovanie 5-25 ml 2XYT média (16 g Bacto-Tryptone (Difco 0123), 10 g Bacto-Yeast extraktu (Difco

0127), 10 g NaCl, pH 7,2-7,4 na liter vody) s obsahom 6 mikrogramov/ml tetracyklínu, ktoré boli kultivované cez noc pri 37 °C, 280 rpm. 1/100 objemu kultivovanej kultúry potom bola použitá na inokulovanie do každej z dvoch 125ml fľaštičiek obsahujúcich 25 ml 2XYT média plus 6 mikrogramov/ml tetracyklínu. Kultúry rástli pri 37 °C, 280rpm dokiaľ A_{580} nebolo 0,5-1,0 absorbančných jednotiek a potom indukované 1 mM izopropyl-beta-D-tiogalaktopyramozidu (IPTG) a kultivované ďalšie 2 hodiny.

S cieľom termálnej indukcie kultúry rástli pri 30 °C, 280 rpm dokiaľ A_{580} nebolo 0,5-1,0 absorbačných jednotiek. Potom bola jedna kultúra udržiavaná pri 30 °C a iná bola indukovaná presunutím do vodného kúpeľa s 42 °C a potom kultivovaná 2 hodiny. Alternatívne bola kultúra indukovaná rastom pri 30 °C dokiaľ A_{580} nebolo 0,3-0,6 absorbačných jednotiek a potom bola rozdelená na dva rovnaké diely, jeden bol udržiavaná na 30 °C a druhý bol kultivovaný pri 42 °C.

Na vyskúšanie výsledkov indukcie boli odobrané duplikátne vzorky s ekvivalentom 1 ml buniek pri $A_{580} = 1,0$ (t.j. predpokladané $A_{580} = 3,0$, ak bolo odobraných 333 mikrolitrov kultúry). Vzorky boli centrifugované na Eppendorfovej mikrocnetrifúge pri 14 000 x g, 1 min., supernatant bol odstránený a bunkové pelety boli uskladnené pri -20 °C.

C. Stabilná štúdia

Baktérie boli postupne naočkované do jednotlivých kolónií a jednotlivé kolónie z troch platničiek boli inokulované do 200 ml XYT média obsahujúce 6 mikrogramov/ml tetracyklínu. Kultúra rástla do $A_{580} = 0,5-1,0$ absorbančných jednotiek a 60 ml bolo odobraných, zmiešaných s 40 ml glycerolu a 1 ml alikvóty boli rozdelené do 100 ml fľaštičiek na uskladnenie pri -80 °C. Zvyšok kultúry bol rozdelený do dvoch alikvótnych častí: jedna bola inkubovaná neindukovaná a druhá bola indukovaná pridaním IPTG alebo posunom teploty. Obidve kultúry rástli ďalšie dve hodiny.

Vzorky ekvivalentnej kultúry pri $A_{580} = 1,0$ boli odobrané pred a 2 h po indukcií a skúšané na A_{580} absorbanciu, pH a produkciu proteínov EIA, akrylamidovou gélovou lektroforézou a Western blottingom.

Tri fľaštičky zo zmrazenej banky boli testované paralelne na bakteriálny rast a produkciu proteínov. Každá fľaštička (1 ml) bola použitá na inokuláciu 200ml 2XYT média plus 6 mikrogramov/ml tetracyklínu a inkubovaná do $A_{580} = 0,5-1,0$ absorbančných jednotiek. Potom bola kultúra rozdelená do dvoch alikvótnych častí, jedna bola inkubovaná neindukovaná a druhá bola indukovaná chemicky alebo termálne. Vzorky ekvivalentné 1 ml kultúry pri $A_{580} = 1,0$ boli odobrané z oboch kultúr a pred a 2 h po indukcií a skúšané ako je popísané vyššie.

S cieľom stabilitnej štúdie boli odobrané 1 ml alikvóty z jednej z troch paralelných kultúr pred indukciou, riedené 1/1 000 2XYT médiu a 20 mikrolitrov bolo inokulovaných do 200 ml 2XYT média plus tetracyklín a kultivovaných do $A_{580} = 0,5-1,0$ absorbančných jednotiek. Potom bola kultúra rozdelená do dvoch alikvótnych častí, jedna bola indukovaná a obidve boli kultivované ďalšie dve hodiny. Vzorky ekvivalentné 1 ml kultúry pri $A_{580} = 1,0$ boli odobrané pred a 2 h po indukcií a skúšané ako je popísané vyššie.

D. Frakcionácia buniek

Bunky boli peletované pomocou centrifugácie 7 000 x g, 7 min a supernatant (kultivačné médium) bol recentrifugovaný pri 14 000 x g, 5 min, pred elektroforézou. Bunkové pelety boli resuspendované v 20% (hmot./objem) sacharóze, 0,3 M Tris-HCl pH 8,0m 1 mM EDTA použitím 1/5 iníciačného objemu kultúry, inkubované pri 25 °C 15 min a centrifugované pri 6 000 x g, 7 min. Supernatant bol oddelený a proteíny uložené v periplazme boli uvoľnené osmotickým šokom (Nossal and Heppel, 1966, J. Biol. Chem., 241: 3055-3062) resuspendovaním do 1/5 originálneho objemu studenej vody a inkubovaním pri 0 °C, 10 min. Po centrifugácii

pri 9 000 x g, 10 min bol odobraný supernatant (periplazmatická frakcia), bunkové pelety boli resuspendované do 1X TST (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM/liter Tween 20), rozrušené ultrazvukom, centrifugované pri 12 000 x g, 15 min a supernatant bol uložený (solubilná frakcia cytozolu).

E. Polyakrylamidová gélová elektroforéza

Zmrazené bunkové pelety *E. coli* boli resuspendované v 70 mikrolitroch vody intenzívnym vortexovaním alebo sonifikáciou pri 0 °C (Sonic Dismembrator, Model 301, ARTEX Systems Corporation) trikrát vždy počas 5 sekúnd, pri nastavení sily 0,4. Rozrušené bunky boli zmiešané s 70 mikrolit. 2X pľúcneho pufra (125mM, Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% beta-merkaptotanol, 0,002% brómfenolová modrá) (Laemli, 1970, Nature, 227: 680-685). Vzorky boli inkubované pri 100 °C, 5 min, centrifugované pri 14 000 x g, 30 sekúnd a 10-15 mikrolit. alikvóty boli zavedené do pripraveného 16% alebo 10-20% akrylamidového Tricine gélu (Novex, San Diego, CA (USA)) a vyvíjané v rezervoárovom pufri od rovnakej firmy. Elektroforéza bola pri konštantnom napätí 125 V, alebo 45 mA konštantného prúdu, na dva gély, dokiaľ brómfenolové modré farbivo nebolo na konci gélu. Markery boli dopredu označené štandardmi proteínov s nízkou molekulovou hmotnosťou (SE 130024, Integrated Separation Systems, Natick, MA (USA)) použité v 1 mikrolit. na dráhu. Gély boli farbené cez noc v 10% kyseline octovej, 25% metanole, 0,025% Coomassie Brilliant Blue R.

F. Western blott analýza

Po separácii SDS-PAGE boli proteíny imunodetegované (Towbin et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4350-4354) pomocou elektrotransféra do polyvinylidén difluoridových (PVDF) membrán (Immobilon-O, Millipore, Bedford, MA (USA)) použitím Semi-Dry elektroblottera (Integrated Separation Systems). Proteíny boli transferované pri 10 mA na cm² membrány 1-3 h a membrány boli blokované cez noc v blokujúcom pufri (1X PBS, 2% sušené mlieko, 0,1% Tween-20).

Membrány boli premývané trikrát, každá raz 5 min v 1X PBS, 0,1% Tween-20, nasledovalo trojité premývanie, vždy 5 min v 1X PBS a potom boli ponorené do: chrenovej peroxidáza (HRP)-konjugovaná monoklonálna anti-V beta 5.3 protilátka (13A2-HRP, 0,25 mg/ml) riedenie 1:3 000 v 1 X PBS, 0,1% Tween-20. Po jemnom premiešaní počas 2 hodín boli membrány premývané ako je popísané vyššie a proteíny boli vizualizované Enhanced Chemiluminiscence assay (Amersham, Arlington Heights, IL (USA)) podľa inštrukcií výrobcu. Expozícia filmu trvala od 5 sekúnd do 1 minúty.

G. Enzýmová imunoesej

Zmrazené bunkové pelety boli resuspendované intenzívnym vortexovaním v 20 mikrolit. 8M močoviny Tris-HCl, pH 8,5 (Marston and Hartley, 1990, Meth. Enzymology, 182: 264-276) a Vbeta 5.3 boli kvantifikované pomocou enzýmoimunoeseje takto:

Nunc Immuno Maxisopr platne (VWR 62409-002) boli potiahnuté 100 mikrolit./jamka 4C2 IgG v 4 mikrogram/ml v PBS a cez noc uskladnené pri 4 °C. Poťahovací roztok bol odstránený a blokujúci pufer (1% kazeínový hydrolyzát v PBS, 0,05% Tween-20) bol pridaný v množstve 200 mikrolit./jamka. Platne boli inkubované pri izbovej teplote 2 h, 150 rpm a potom premývané 3 x premývacím pufrom (PBS, 0,05% Tween-20). Vzorky (riedené 1/2 000 alebo 1/32 000) a Vbeta 5.3 štandardy v blokujúcom puffri boli pridané v množstve 100 mikrolit./jamka a inkubované pri izbovej teplote 90 min, 150rpm. Platne boli premývané 3 x premývacím pufrom a HRP-konjugáty anti-Vbeta 5.3 monoklonálnej protilátky (13A2-HRP) s riedením 1/500 v blokujúcom puffri plus fetálne hovädzie sérum boli pridané v množstve 100 mikrolit./jamka (0,5 mikrogram/ml). Platne boli inkubované pri izbovej teplote 90 min, 150 rpm, trikrát premývané a bol pridaný O-fenyléndiamín (OPD) substrát v množstve 100 mikrolit./jamka. Po 30 minútach boli reakcia ukončená pridaním 50 mikrolit. 2N H₂SO₄ na jamku. Absorbancia bola meraná pri 490 nm mínus absorbancia pozadia pri 650 nm.

Prázdné jamky neobsahovali vzorku.

2. KONŠTRUKCIA PLAZMIDU

Príklad 1

Konštrukcia pK2D

Prvým bodom pri expresii proteínov v regiónu antigénneho receptora T buniek vynálezu bola konštrukcia plazmidu, ktorý obsahuje vlastné regulačné elementy pre expresiu proteínov v regiónu antigénneho receptora T buniek. Tieto elementy zahŕňujú promotor, dva terminátory transkripcie, zdroj replikácie pre stabilnú replikáciu v baktériách. Navyše, keďže sú regulačné oblasti asociované s výrobou proteínov, kde je možné indikáciou použitie in vivo v terapeutickej podobe, bol vybraný gén kódujúci rezistenciu na tetracyklín na uľahčenie selekcie buniek nesúcich plazmid. Konečne, úvodný expresný vektor vyžaduje multiplikovateľné klonujúce miesto, strategicky umiestené na uľahčenie klonovania preferovaných kódujúcich regiónov vynálezu do expresného vektora. Nasledujúci príklad popisuje unikátny úvodný plazmid vynálezu.

Prvým bodom konštrukcie preferovaného expresného vektora bol pKK233-2 (4.6 kb), popísaný infra. NcoI reštrikčné miesto bolo konvertované na SpeI miesto takto: pKK233-2 bol natrávený NcoI a výsledný 5' presahujúci koniec bol odstránený pomocou inkubácie s "mun bean" nukleázou pri 25 °C 30 min. Plazmidy boli extrahované dvakrát fenolchloroformom, precipitované etanolom v prítomnosti 2 M octánu amónneho a resuspendované vo vode. Po defosforylácii pomocou bakteriálnej alkalické fosfatázy (GibcoBRL), bol vektor ligovaný na syntetický SpeI linkér (1085, New England Biolabs) a ligačná zmes bola transformovaná do DH5a kompetentných buniek s cieľom získania vektora pKK233-2A.

Ďalej bol tetracyklínový gén opäť zavedený takto: pKK233-2A (4,6 kb) bol natrávený EcoRI a SalI pri získaní dvoch fragmentov,

279 bp a 4321 bp. Dva fragmenty boli separované pomocou gélovej elektroforézy na agaróze a dlhší fragment bol purifikovaný z agarózy použitím Geneclean kitu (BIO 101, La Jolla, CA (USA)). 651-bp fragment obsahujúci amino-terminálny kódujúci región tetracyklínového génu bol excidovaný EcoRI a SalI z pBR322 a ligovaný na 4321-bp fragment pKK233-2A. Výsledný plazmid pK2B (4,97 kb) dával rezistenciu na tetracyklín E. coli DH5a bunkám a bol ďalej modifikovaný s cieľom delécie časti beta-laktamázového génu a konverzie HindIII miesta do SacII miesta takto:

DNA fragment v rozsahu od jediného Spe I miesta do 3' konca transkripčného teminátora bol PCR syntetizovaný použitím pK2B ako templátu. 5' "sense" primér obsahoval túto rozpoznávaciu sekvenciu pre SpeI, PstI a SacII v 5'-3' smere:

5' - TATAATGACTAGTCGCTGCAGCCAACCGCGG - 3' (SEQ ID NO 1)

3' "antisense" primér obsahujúci ScaI miesto podčiarknuté:

5' - GTCCTAGAGTACTGAGCGGATAC - 3' (SEQ ID NO 2)

1ng pKB DNA templátu bol zmiešaný v reakčnom objeme obsahujúcom 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 100 mikrogramov želatíny, 200 mikrom každého deoxynukleotidu (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 mikrom každého z dvoch primérov a 2,5 jednot. AmpliTaq DNA polymerázy. Finálny reakčný objem bol 100 mikrolit. prekrytý 100 mikrolit. minerálneho oleja. DNA bola denaturovaná pri 95 °C 2 min a amplifikácia bola dosiahnutá pomocou 30 cyklov 1 min denaturácie pri 95 °C, 1 min pri 60 °C s cieľom tepelného spracovania a 1 min pri 72 °C s cieľom extenzie priméru. Amplifikovaná DNA bola analyzovaná na 1% agarózovom géle v 40 mM Tris-HCl pH 7,8, 5 mM Na acetátu, 1m EDTA.

Výsledný 485-bp PCR syntetizovaný fragment bol trávený SpeI a ScaI a ligovaný na 4129-bp fragment, ktorý bol získaný pomocou digescie pK2B SpeI a ScaI pri vytvorení plazmidu nazvaného pK2C.

Plazmid pK2C (4,6 kb) bol ďalej modifikovaný tak, aby obsahoval multiplikované klonujúce miesto. Najprv bol pK2C

natrávený SpeI a SacII a ligovaný na dvojreťazcový syntetický oligonukleotid obsahujúci 15 reštrikčných miest. Toto multiplikované klonujúce miesto (MCS) bolo formované pomocou tepelného spracovania ekvimolárnych koncentrácií dvoch komplementárnych syntetických oligonukleotidov, 91 a 97 bp dlhých, majúcich túto sekvenciu:

```
5'-GGCTCGAGCCTAGGCTGCAGCCCGGGCGCGCGCGGCCGAGGCC
TTTAATTAAGAGCTCCGGACCGCACAAATGTGGGCGCGCCCTTAAGA-3'
[SEQ ID NO 3]
5'-CTAGTCTTAAGGGCGCGCCACATTGTGCGGTCCGGAGCTCTTAA
TTAAAGGCCTGCGGCCGCGCGCGCCCGGGCTGCAGCCTAGGCTCGAG
CCGC-3' [SEQ ID NO 4]
```

MCS kóduje tieto miesta pre reštrikčné enzýmy: SpeI, AflIII, AscI, DraIII, RsrII, SacI, PacI, StuI, NotI, BssHII, XmaI, PstI, AvrII, XhoI a SacII. Ligačná zmes bola transformovaná do metyláza-negatívnej *E. coli* GM2929. Výsledný plazmid pK2D (4,67 kb) bol čiastočne sekvenovaný, aby sa zaistila integrita in vitro syntetizovaných regiónov.

Výsledky

Začiatočným plazmidom bol pKK233-2, ktorý obsahoval tieto elementy: trc promotor (Brosius et al., (1985) supra), ktorý je podobný tac promotoru odvodenému pomocou fúzie 10regiónu lacUV5 promotora s -35 regiónom tryptofánového promotora (de Boer et al., (1983), supra, Amann et al., (1983), supra). Plazmid tiež obsahuje ribozómové väzbové miesto nasledované klonujúcim miestom pre tri unikátne reštrikčné enzýmy (NcoI, PstI a HindIII), nasledované transkripčnými terminátormi rrnB ribozomálneho RNA operónu *E. coli* (Brosius et al., 1981. Plazmid, 6: 112-118). Navyše, pKK233-2 obsahuje beta-laktamázový gén pre ampicilínovú rezistenciu, pBR322 zdroj replikácie a malý nefunkčný karboxyterminálny fragment z génu tetracyklínovej rezistencie.

pKK233-2 bol modifikovaný tak, aby bolo zrušené NcoI miesto,

obnovený gén tetracyklínovej rezistencie, oddelený segment beta-laktamázového kódujúceho regiónu (tak inaktivujúci gén) a pripojené multiplikované klonujúce miesto zložené z 15 reštrikčných miest a tak bol vyprodukovaný pK2D.

Príklad 2

Plazmid pK2D bol ďalej modifikovaný pre inkorporovanie buď pelB signálnej sekvencie z *Erwinia carotovora* (Lei et al., 1987, J. Bacteriology, 169: 4379-4383), alebo termostabilnej enterotoxín II (STII) signálnej sekvencie z *Escherichia coli* (Morioka - Fujimoto et al., 1991, J. Biol. Chem., 266: 1728-1732).

Konštrukcia pK-pelB

Plazmid pK2D (4,67 kb) bol potom spracovaný tak, aby zahrnoval ribozómové väzbové miesto (Shine et Dalgarno, 1974 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71: 1342-1346, Shine et Dalgarno, 1975, Nature, 254: 34-38, Steitz and Jakes, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 4734-4738) a pelB signálnu sekvenciu z *E. carotovora* (Lei et al., (1987) supra) s cieľom vytvorenia plazmidu pK-pelB (4,74 kb):

pK2D bol trávený SpeI a ScaI umiestenými v MCS a vektor bol ligovaný do dvoch komplementárnych syntetických oligonukleotidov, 103 bp a 95 bp dlhých, majúcich sekvencie uvedené nižšie. Tiché mutácie (malé písmená) boli uvedené do pelB sekvencie, aby sa vytvorilo NcoI reštrikčné miesto (podčiarknuté) a tak sa uľahčilo následné subklonovanie Vbeta 5.3 génovej sekvencie.

5'-CTAGTAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACC
TATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCA
GCcATGGCCGAGCT - 3' [SEQ ID NO 5]

5'-CGGCCATgGCTGGTTGGGCAGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCT
GCCGTAGGCAATAGGTATTTCAATTATGACTGTCTCCTTGAAATAGA
ATTTA - 3' [SEQ ID NO 6]

Konštrukcia pK-STII

Plazmid pK2D bol potom spracovaný tak, aby obsahoval ribozómové väzbové miesto a signálnu sekvenciu termostabilného enterotoxínu (STII) *E. coli* (Morioka - Fujimoto et al., (1991) supra):

pK2D bol trávený SpeI a DraIII umiestenými v MCS a vektor bol ligovaný do dvoch komplementárnych syntetických oligonukleotidov, 105bp a 98bp dlhých, majúcich sekvencie uvedené nižšie. Tiché mutácie (malé písmená) boli uvedené do STII sekvencie, aby sa vytvorili MluI a DraIII reštrikčné miesta (podčiarknuté) a tak sa uľahčilo následné subklonovanie Vbeta 5.3 génovej sekvencie.

5'-CTAGTAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAAAAGAA
TATAGCATTCTACTAGCTTCAATGTTTCGTTCTTCTATTGCAACTA
ACGCgTACGCgCATT - 3' [SEQ ID NO 7]

5'-GcGCGTAcGCGTTAGTTGCAATAGAGAAGACGAACATTGAAGCT
AGTAGGAATGCTATATTCTTTTTCATTATGACTGTCTCCTTGAAATA
GAATTTA - 3' [SEQ ID NO 8]

Príklad 3

Plazmidy obsahujúce signálne sekvencie z Príkladu 2 supra boli ďalej modifikované tak, aby obsahovali dva regulačné elementy.

Konštrukcia pKT-pelB

Plazmid pK-pelB bol ďalej modifikovaný s cieľom vytvorenia pKT-pelB (4,8kb) tak, aby obsahoval dva regulačné elementy upstream od pelB leadera. Tieto elementy sú translačné enhancéry

z bakteriofágového T7 génu 10 (g10) mini-cistron ATG TAT CGA TTA AAT AAG GAG GAA TAA (SEQ ID NO 28), kódujúce pre 8 aminokyselinový zvyšok. Insercia dvoch regulačných elementov bola dosiahnutá pomocou digestie pK2D SpeI a SacI, nasledovanej ligáciou vektora do syntetických oligonukleotidov kódujúcich pre g10 sekvenciu, ribozómové väzbové miesto, mini-cistron a pelB leader, v 5'-3' smere. Oligonukleotidy boli syntetizované ako dva komplementárne sady 71-89 mérov, ktoré môžu byť ligované cestou komplementárnych 9bp presahov medzi pármí oligonukleotidov. Dva komplementárne páry oligonukleotidov boli označené ako pár A (oligos J5A+J6A, 89bp a 76bp) pár B (oligos J5B+J6B, 71bp a 76bp) a majú túto sekvenciu:

J5A

5'-CTAGTCCGGAATTGGGCATCGATTAACCTTTATTATTAATAAAATTAA
AGAGGTATATATTAATGTATCGATTAAATAAGGAGGAATAAATA-3' [SEQ ID NO 9]

J6A

5'-CTCCTTATTTAATCGATACATTAATATATACCTCTTTAATTTTAA
ATAATAAAGTTAATCGATGCCCAATTCGGA-3' [SEQ ID NO 10]

J5B

5'-ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTC
GCTGCCCAACCAGCCATGGCCGAGCT-3' [SEQ ID NO 11]

J6B

5'-CGGCCATGGCTGGTTGGCCAGCGAGTAATAACAATCCAGCCGCTG
CCGTAGGCAATAGGTATTTATTATTATTC-3' [SEQ ID NO 12]

Konštrukcia pKT-STII

Plazmid pK-STII by ďalej modifikovaný s cieľom vytvorenia pKT-STII (4,8kb) tak, aby obsahoval rovnaké dva regulačné elementy ako pKT-pelB. pK2 bol trávený SpeI a DraIII a vektor bol ligovaný do syntetických oligonukleotidov kódujúcich pre g10 sekvenciu, ribozómové väzbové miesto, mini-cistron a STII leader, v 5'-3' smere. Oligonukleotidy boli syntetizované ako dve komplementárne sady 73-89 mérov, ktoré môžu byť ligované cestou komplementárnych 9bp presahov pármí oligonukleotidov. Dva komplementárne páry oligonukleotidov boli označené ako pár A

(oligos J5A+J6A, 89bp a 76bp) a pár B (oligos J5C+ J6C, 73bp a 76bp) a majú túto sekvenciu:

J5A

5'-CTAGTCCGGAATTGGGCATCGATTAACCTTTATTATTAAAAATTAA
AGAGGTATATATTAATGTATCGATTAAATAAGGAGGAATAAATA-3' [SEQ ID NO 9]

J6A

5'-CTCCTTATTTAATCGATACATTAATATATACCTCTTTAATTTTA
ATAATAAAGTTAATCGATGCCCAATTCCGGA-3' [SEQ ID NO 10]

J5C

5'-ATGAAAAAGAATATAGCATTCTACTAGCTTCAATGTTCTGCTT
CTCTATTGCAACTAACGCGTAGCGCACATT-3' [SEQ ID NO 13]

J6C

5'-GTGCGTACGCGTTAGTTGCAATAGAGAAGACGAACATTGAAGC
TAGTAGGAATGCTATATTCTTTTTCATTATTTATTTC-3' [SEQ ID NO 14]

Príklad 4

Konštrukcia pK-pelB-Vbeta 5.3

Ďalším krokom pri expresii proteínov Vbeta 5.3 antigénneho receptora T buniek bola inkorporácia Vbeta 5.3 sekvencie do plazmidov obsahujúcich signálne sekvencie, ako je popísané v Príklade 2 supra.

Kompletná nukleotidová sekvencia Vbeta 5.3 bola generovaná takto: DNA sekvencia Vbeta 5.3 klonu 12A1 bola originálne publikovaná Leidenom a spol. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 4456-4460) a neskôr častejšie opravená (Leiden et al., 1986, Molec. Cell Biol., 6: 3207-3214). Tento klon 12A1 neobsahoval nukleotidy kódujúce pre štyri N-terminálne aminokyselinové reziduá, a navyše, vyvodené N-terminálne aminokyselinové reziduá klonu 12A1 neboli správne. N-terminálne aminokyselinové sekvencie Vbeta 5.3 (HPB-ALL) boli publikované Jonesom a spol. 1985, Science, 227: 311-314, bez špecifikácie prvého N-terminálneho aminokyselinového zvyšku, ktorý bol neskôr určený ako glycín (Jeff Leiden, nepublikované). Použitím skorších informácií o

sekvencii bol zrekonštruovaný kompletný Vbeta 5.3 pomocou rekombinantných DNA techník. Výsledný plazmid (pBB-Vbeta 5.3) bol zdrojom Vbeta 5.3 sekvencie pre nasledujúce príklady. Kompletná nukleotidová sekvencia kódujúca pre Vbeta 5.3 a predpokladaná aminokyselinová sekvencia bola publikovaná novšie Plazom et al., (1991, J. Immunol., 147: 4360-4365) (Pozri tiež obr. 1, SEQ ID NOS 25, 26 a 27).

Vbeta 5.3 bol PCR syntetizovaný použitím pBB-Vbeta 5.3 (6,2kb) ako templátu. 5' "sense" primér obsahoval miesto pre reštrikčný enzým NcoI (podhrnuté):

5' - TAATTAGCCATGGCCGGCGTAACCCAATCTCCG - 3' [SEQ ID NO 15]

3' "antisense" primér bol komplementárny k regiónu "downstream" od PstI miesta vektora:

5' - CCAGTGCCAAGCTTGCATGCC - 3' [SEQ ID NO 16]

Výsledný Vbeta 5.3 fragment bol tupo zakončený použitím Klenow fragmentu DNA polymerázy I a ligovaný do defosforylovaného EcoRV miesta pBluescript II KS+ pri získaní plazmidu pBL-pelB-Vbeta 5.3. Vbeta 5.3 insert bol excidovaný digesciou NcoI a PstI, purifikovaný z agarózy a ligovaný do NcoI a PstI miest pK-pelB pri získaní plazmidu pK-pelB-Vbeta 5.3 (5kb).

Konštrukcia pK-STII-Vbeta 5.3

Vbeta 5.3 bol PCR syntetizovaný použitím pBB-Vbeta 5.3 (6,2kb) ako templátu. 5' "sense" primér obsahoval miesto pre reštrikčný enzým MluI (podčiarknuté):

5' - GAAATTAACGCGTACGCAGGCGTAACCCAATCTC - 3' [SEQ ID NO 17]

3' "antisense" primér bol komplementárny k regiónu "downstream" od PstI miesta vektora:

5' - CCAGTGCCAAGCTTGCATGCC - 3' [SEQ ID NO 18]

Výsledný Vbeta 5.3 primér bol tup zakončený použitím Klenow fragmentu DNA polymerázy I a ligovaný do defosforylovaného EcoRV miesta pBluescript II KS+ pri získaní plazmidu pBL-STII-Vbeta 5.3 (5 kb).

Konštrukcia pK-STII-Vbeta5.3

Vbeta5.3 bol PCR-syntetizovaný použitím pBB-Vbeta5.3 (6,2 kb) ako templátu. 5'-"sense" primér, obsahujúci MluI reštrikčné enzýmové miesto, podčiarknuté:

5' - GAAATTAACGCGTACGCAGGCGTAACCCAATCTC - 3' [SEQ ID NO 17]

3' "antisense" primér bol komplementárny k regiónu "downstream" od PstI miesta vektora:

5' - CCAGTGCCAAGCTTGCATGCC - 3' [SEQ ID NO 18]

Výsledný Vbeta 5.3 fragment bol tupo zakončený Klenovovým fragmentom DNA polymerázy I a ligovaný do defosforylovaného EcoRV miesta pBluescript II KS+ pri získaní plazmidu pBL-STII-Vbeta5.3. Vbeta5.3 insert bol excidovaný digesciou MluI a PstI, purifikovaný z agarózy a ligovaný do MluI a PstI miest pK-STII pri získaní plazmidu pK-STII-Vbeta 5.3 (5kb).

Výsledky

Vbeta 5.3 fuzionovaný s pelB alebo STII leadermi bol exprivovaný v E. coli JM 109 (tabuľka 1). Indukcia trvala 2 h a výťažky Vbeta 5.3 boli merané EIA.

Tabuľka 1

Expresia a kompartmentácia Vbeta5.3

Kompartment	pK-pelB-Vbeta5.3		pK-STII-Vbeta5.3	
	0 mM IPTG	1 mM IPTG	0 mM IPTG	1 mM IPTG
Supernatant (mikrogram/ml)	0	1,3	0,5	2,2
Periplazma	0,9	4,6	N.D.	5,5
Cytozol	9,9	mimo stupnicu	2,0	mimo stupnicu

Obidva leadery boli funkčné, aj keď väčšina exprivovaného proteínu bola lokalizovaná intracelulárne.

Príklad 5

Tento príklad upresňuje plazmid obsahujúci leader sekvenciu a dva regulačné elementy (g10 a mini-cistron), ako aj Vbeta 5.3 sekvenciu.

Konštrukcia pKT-pelB-Vbeta 5.3

Plazmid pKT-pelB-Vbeta 5.3 bol skonštruovaný pomocou excízie Vbeta 5.3 insertu z pK-pelB-Vbeta 5.3 použitím NcoI a PstI a ligácie do NcoI a PstI miest pKT-pelB.

Konštrukcia pKT-STII-Vbeta 5.3

Plazmid pKT-STII-Vbeta 5.3 bol skonštruovaný podobne pomocou excízie Vbeta 5.3 insertu p pK-STII-Vbeta použitím MluI a PstI a ligácie do MluI a PstI miest pKT-STII.

Všetky nasledujúce plazmidové konštrukty používajú STII signálne sekvencie. Preto tak, kde nie signálna sekvencia špecifikovaná, je myslené použitie STII sekvencie.

Výsledky

pKT-Vbeta 5.3

Plazmid pK-STII-Vbeta 5.3 (príklad 4) bol modifikovaný tak, aby obsahoval dva regulačné elementy "upstream" od STII leadera a tak vytvoril pKT-Vbeta 5.3. Týmito elementmi je translačný enhancér z bakteriofágového T7 génu 10 (g10) a mini-cistron kódujúci 8 aminokyselinovaných reziduí. Pokiaľ ide o obidva elementy, bolo demonštrované, že zvyšujú účinnosť translácie mnohých génov (Schoner et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

81: 5403-5407), Schoner et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 8506-8510, Olins et al., 1988, Gene, 73: 227-235 a Rangwala, 1989, J. Biol. Chem., 264: 16973-16976).

pKT-Vbeta 5.3 poskytoval 8 x vyšší proteínový výnos ako pK-STII-Vbeta 5.3 (Príklad 4) v *E. coli* JM109 pri podmienkach IPTG indukcie. Uvedené EIA hodnoty sú približné vzhľadom na nedostupnosť čistých Vbeta 5.3 štandardov v tejto dobe. pKT-Vbeta 5.3 sa ukázal byť stabilný v *E. coli* JM109.

Príklad 6

Konštrukcia pKTB-Vbeta 5.3

Ďalšia modifikácia pKT-Vbeta 5.3 (Príklad 5) pre sekretovanú expresiu vyžadovala elimináciu potreby IPTG pre indukciu. Existencia *lacIts* génu kódujúceho pre teplotne senzitívny *lac* receptor (Bukrinsky et al., 1988, Gene, 70: 415-417) umožnila kontrolu génovej expresie z *trc* promotora zvýšením teploty z 30 °C na 42 °C. To by malo predísť potrebe použitia IPTG alebo bakteriálnych kmeňov nesúcich *IacI* alebo *lacI^q* gény.

lacIts gén bol excidovaný z pUCTs pomocou digescie *EcoRI*. 1.7 kb fragment obsahujúci celý *lacIts* kódujúci región a jeho asociované regulačné elementy, sprevádzané vektorovou sekvenciou, boli tupo zakončené Klenowom a ligované do defosforylovaného *ScaI* miesta, lokalizovaného "downstream" od *rrnB* operónu v pKT-Vbeta 5.3, za vzniku plazmidu pKTB-Vbeta 5.3 (6,8 kb). Orientácia *lacIts* génu bola určená pomocou reštrikčného mapovania.

Výsledky

lacIts gén bol insertovaný v jednej alebo druhej orientácii "downstream" od *rrnB* transkripčných terminátorov v pKT-Vbeta 5.3, pri vytvorení pKTB-Vbeta 5.3 (obr. 2). Tento bol expriovaný v *E. coli* LJ24 (*lacI* delécia) a proteín bol analyzovaný Coomassie Blue farbením na arlyamidovom géle (Laemmli, (1970), supra) a Western

Blot-om (Towbin et al., (1979), supra). Jedna orientácia lacIts génu (transkripčný smer smerom k Amp³ regiónu) jasne viedla k vyššiemu výnosu Vbeta 5.3 ako reverzná orientácia.

Putatívny Vbeta 5.3 prúžok získaný z extraktov všetkých bunkových peliet bol elektrotransferovaný do Immobilon-P membrán a vizualizovaný Coomassie Blue farbením. Prúžok bol excidovaný a podrobený NH₂-terminálnemu aminokyselinovému sekvencovaniu (Matsudaira, 1987, J. Biol. Chem., 262: 10035-10038) pri výnose všetkých 10 aminokyselinových reziduí. To precízne ukázalo sekvencie N-terminálnych 10 aminokyselinových reziduí spracovaného Vbeta 5.3, t.j. žiadne leader sekvencie neboli detegované.

Plazmid bol tiež exprivovaný pomocou termálnej indukcie v troch rôznych bakteriálnych kmeňoch, kde každý z nich obsahoval vyššie hladiny endogénneho lac represora, t.j. LJ24<DH5 alfa<JM109. Supernatanty z indukovaných kultúr boli skúšané na Vbeta 5.3 expresiou EIA (Tabuľka 2).

Tabuľka 2

pKTB-Vbeta5.3 expresie v rôznych bakteriálnych kmeňoch

Bunky boli indukované 2 h a výťažky Vbeta5.3 (mikrogram/ml) boli merané v supernatante kultúry

Plazmid	regulácia	E. coli host.	indukcia	neinduk.	induk.
pKTB-Vbeta5.3	lacIts	JM109(lacI ^q)	42 °C	N.D.	0,5
pKTB-Vbeta5.3	lacIts	DH5alfa(lacI)	42 °C	N.D.	5,0
pKTB-Vbeta5.3	lacIts	LJ24(delta lacI)	42 °C	N.D.	5,2
pKT-Vbeta5.3	lacI ^q	JM109	2mM IPTG	0	0,9
pKT	lacI ^q	JM109	42 °C	N.D.	0

Dáta sú v súlade s Western blot pozorovaním a predpokladanými výsledkami, t.j. vyššia expresný hladina bola dosiahnutá v LJ24 (*lacI*) a nižšia v JM 109 (*lacI^q*). Pomerne nízke množstvá Vbeta 5.3 merané v supernatante kultúry vychádzajú z faktu, že *E. coli* bežne nesecernuje proteíny do média. Ako ukazuje Tabuľka 1, väčšina expriovovaného Vbeta 5.3 je zadržovaná v periplazme.

DNA sekvencovanie *lacIts* génu

Celá kódujúca sekvencia teplotne indukovateľného *lacIts* génu plus "upstream" 80 nukleotidov vrátane promotora bola sekvencovaná a porovnávaná s publikovanými sekvenciami IPTG-indukovateľného *lacI* génu (Farabaugh, 1978, Nature, 274: 765-769). Promotorový región bol identický k tomu istému *lacI*, ale nie *lacI^q* génu (Calos M. P., 1978, Nature, 274: 762-765).

lacIts génová sekvencia vykazovala otvorený čítací rámček 1 080 nukleotidov kódujúcich 360 aminokyselín a líšila sa od *lacI* génu v nukleotide číslo 559 (s odkazom na prvý nukleotid štart kodónu), ktorý bol zmenený z G na A, spôsobiac tak zmenu aminokyselinového zvyšku číslo 187 z glycínu (GGC) na serín (AGC). Táto zmena jediného aminokyselinového zvyšku udáva termálnu senzitivitu *lac* represorového proteínu.

Navyše, publikované sekvencie *lacI* génu (Farabaugh, (1978) supra), rovnako ako sekvencia objavená v Genebank (lokus ECOLAC), obsahuje chybu v pozícii číslo 857: nukleotid číslo 857 by mal byť T namiesto C, ktorý by mal tvoriť zvyšok číslo 286 kódujúci pre Leucín (TTA) namiesto Serínu (TCA). Prechod C-T vkladá HpaI miesto do 3' konca *lacI* génu, ktorý bol predtým ukázaný pomocou reštrikčného mapovania (Brosius, 1992, Meth. Enzymology., 216: 469-483). Maloby byť zmienené, že vo Farabauchovi, (1978) supra, je rovnaký kodón (TCA) chybne popísaný ko kódujúci Leucín namiesto Serínu.

Príklad 7ä

Konštrukcia pKTB

Plazmid pKTB-Vbeta 5.3 (6,7kb) bol trávený SalI a PstI a 5,4kb fragment bol purifikovaný z agarózy použitím Geneclean Kitu (BIO 101). Plazmid pKT-STII (4,8kb) bol trávený SalI a PstI a 1,15kb fragment bol podobne purifikovaný a ligovaný na 5,42kb fragment za vzniku plazmidu pKTB (6,56kb).

Príklad 8

Konštrukcia pKB-Vbeta 5.3

Tento plazmid je identický s pKTB-Vbeta 5.3 mínú dva regulačné elementy, t.j. g10 translačný enhancér a mini-cistron. Plazmid pKTB (6,56kb) bol trávený SalI a PstI a väčší fragment (5,4kb) bol purifikovaný z agarózy použitím Geneclean Kitu (BIO 101). Plazmid pK-Vbeta 5.3 (4,9kb) bol trávený SalI a PstI a 1,3kb fragment bol rovnako purifikovaný a ligovaný na 5,4 kb fragment za vzniku plazmidu pKB-Vbeta 5.3 (6,7kb).

Výsledky

pKB-Vbeta 5.3

Ako je diskutované vyššie, pridanie dvoch regulačných elementov, t.j. g10 génového segmentu a mini-cistron vykazuje zvýšenie Vbeta 5.3 výnosu pri podmienkach IPTG indukcie. Chceli sme odstrániť tieto dva elementy z pKTB-Vbeta 5.3 vektora a opäť preskúšať výnos pri podmienkach termálnej indukcie. Porovnanie pKTB-Vbeta 5.3 a pKT-Vbeta 5.3 pomocou akrylamidovej elektroforézy a Western blottingom ukázalo, že výnos Vbeta 5.3 bol neovplyvnený odstránením dvoch elementov. EIA meranie ureových extraktov celých buniek ukázalo, že pKB-Vbeta 5.3 produkuje viac proteínu ako pKTB-Vbeta 5.3, ak je exprirovovaný v E. coli LJ24.

Tabuľka 3

Expresia Vbeta5.3 v rôznych bakteriálnych kmeňoch

Plazmid	LJ24	SG22094	SG21163	SG21173
pKTB-Vbeta5.3 + leader + g10/MC	90	80	20	30
pKB-Vbeta5.3 + leader + g10/MC	110	50	40	20
pKTBi-Vbeta5.3 + leader + g10/MC	6	100	100	100
pKBi-Vbeta5.3 + leader + g10/MC	10	170	130	390

indukčná perióda: 2 h pri 42 °C

objem kultúry: 25 ml

Leader: STII

g10: T7 gén10

MC: minicistron

vzorky: extrakty celých buniek moču

Vbeta5.3 výťažky (mg/liter); založené na jednotky/ml aproximácii, merané pomocou EIA. 1 mg Vbeta5.3 je približne ekvivalentný 1 x 10⁷ jednotiek.

Plazmid pKB-Vbeta 5.3 bol demonštrovaný ako stabilný pre fermentáciu.

Príklad 9

Konštrukcia pKB

Plazmid pKTB (6,56kb) bol trávený SalI a PstI a veľký fragment (5,4kb) bol purifikovaný z agarózy použitím Geneclean Kitu (BIO 101). Plazmid pK.STII (4,75kb) bol trávený SalI a PstI a 1,1 kb fragment bol podobne purifikovaný a ligovaný na 5,4 kb fragment za vzniku plazmidu pKB (6,5kb).

Príklad 10

Konštrukcia pKTBi

Tento plazmid je identický s pKTb mínus STII signál. sekven.. pKTb (6,56kb) bol trávený SpeI a XmaI a ligovaný do dvojreťazcového syntetického oligonukleotidu kódujúceho pre g10 translačný enhancér, ribozómové väzbové miesto a mini-cistron obsahujúci druhé ribozómové väzbové miesto. Reštrikčné miesta pre NcoI, DraIII a XmaI boli označené na 3' konci. Dva komplementárne oligonukleotidy mali tieto sekvencie:

5'-CTAGTCCGGAATTGGGCATCGATTAAC TTTATTATTA AAAAATTA
AAGAGGTATATATTAATGTATCGATTAAATAAGGAGGAATAAAACC
ATGGCACATTGTGCGGTCCGC - 3' [SEQ ID NO 19]

5'-CCGGCGGACCGCACAAATGTGCCATGGTTTATTCCTCCTTATTTA
ATCGATACATTAATATATACCTCTTTAATTTTAAATAATAAAGTTA
ATCGATGCCCAATTCCGGA - 3' [SEQ ID NO 20]

Príklad 11

Konštrukcia pKBi

Tento plazmid je identický s pKB mínus STII signál. sekven.. pKTb (6,56kb) bol trávený SpeI a DraIII a ligovaný do dvojreťazcového syntetického oligonukleotidu obsahujúceho ribozómové väzbové miesto a NcoI a DraIII miesta označené na 3' konci. Dva komplementárne oligonukleotidy mali tieto sekvencie:

5'-CTAGTAAATTATATTTAAAGGAGGAATAAACCATGGCACATT - 3' [SEQ ID NO 21]

5'-GTGCCATGGTTTATTCCTCCTTTAAATATAATTTA - 3' [SEQ ID NO 22]

Príklad 12

Konštrukcia pKTBi-Vbeta 5.3

Tento plazmid je identický s pKTB-Vbeta 5.3 mínus STII signál. sekven.. pKTBi (6,4kb) bol trávený XmaI a NcoI a ligovaný do PCR syntetizovaného Vbeta 5.3 použitím pKTB-Vbeta 5.3 ako templátu. 5' "sense" primér obsahoval miesto pre reštrikčný enzým NcoI (podčiarknuté):

5' TATAGTCCATGGGCGTAACG - 3' [SEQ ID NO 32]

3' "antisense" primér obsahoval XmaI miesto (podčiarknuté):

5' AACTTCCCCGGGTTATCATTAGCTGC - 3' [SEQ ID NO 24]

Výsledky

pKTBi-Vbeta 5.3

Paralelne s vyššie uvedenou prácou bol STII leader odstránený z expresného plazmidu. Pretože väčšina exprivovaného Vbeta 5.3 je zadržovaná intracelulárne (tiež pozri nižšie), bolo očakávané, že rozsah tohto konštruktú by mohol prinášať heterogénnu populáciu Vbeta 5.3 molekúl, t.j. plus a mínus leader, ktorá by mohla komplikovať následnú purifikáciu spracovaného Vbeta 5.3. Preto bol STII leader odstránený za vzniku pKTBi-Vbeta 5.3 pre intracelulárnu expresiu. Pokiaľ ide o exprivovaný Vbeta 5.3, je očakávané, že obsahuje N-terminálny metionín, aj keď táto aminokyselina môže byť odstránená pomocou endogénnych metionín aminopeptidáz (Ben-Bassat et al., 1987, J. Bacteriology, 169: 751-757, Baneyx and Georgiou, "Expression of Proteolytically Sensitive Polypeptides in Escherichia coli", v Stability of Protein Pharmaceuticals, Part. A. Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation (Tim J. Ahern and Mark C. Manning, eds.), Plenum Press, New York, Str. 69-108 (1992)), ako bolo pozorované pre pKBi-Vbeta 5.3 (nižšie).

pKTBi-Vbeta 5.3 bol kompletovaný, ale zlyhal v expresii signifikantných hladín proteínu v E. coli LJ24 (pozri Tabuľka 3 supra). Celý Vbeta 5.3 insert bol sekvenovaný a determinovaný ako jednoznačne správny. Plazmidová DNA izolovaná po indukcii a analyzovaná pomocou reštrikčnej digestie sa javila nealterovaná. Jedno možné vysvetlenie pre zrejmé zlyhanie LJ24 kmeňa

obsahujúceho pKTBi-Vbeta 5.3 pre expresiu signifikantných hladín Vbeta 5.3 proteínov je, že absencia leader peptidu destabilizuje intracelulárny Vbeta 5.3 proteín a vedie k jeho rýchlej proteolýze.

Preto bol pKTBi-Vbeta 5.3 transformovaný do proteáza deficientných kmeňov SG22094 (lon',clp') a BL21 (lon',ompT'), ktoré dávali nižší výťažok tak, aby SG22094 > BL21. Vplyv rôznych indukčných teplôt na výťažok bol tiež skúšaný a pre obidva kmene bolo 42 °C optimálnych. Navyše tu nebolo signifikantné zvýšenie produkcie medzi 2 h a 5 h.

pKTBi-Vbeta 5.3 bol exprivovaný na dvoch ďalších proteáza deficientných kmeňoch: SG21163 (lon',htp') a SG21173 (lon', htp', clp'). Výsledky sú sumarizované v Tabuľke 3 (supra).

Malo by byť spomenuté, že kmene LJ24, SG22094, SG21163 a SG21174 neprodukujú endogénny lac represor, pretože lac gén je deletovaný vo všetkých týchto kmeňoch. Tak divoký typ lac represora neinterferuje s termálnu indukciou trc promotora. Prechádzajúce príklady ukazujú, že Vbeta 5.3 konštrukty bez signálneho peptidu môžu byť ľahko exprivované v proteáza deficientných hostiteľoch, rezultujúc tak v produkcii signifikantného množstva Vbeta 5.3 proteínu.

Príklad 13

Konštrukcia pKBi-Vbeta 5.3

Tento plazmid je identický s pKTBi-Vbeta 5.3 mínus g10 element a mini-cistron (SEQ ID NO 28). Plazmid pKBi (6,43kb) bol trávený NcoI a SalI a 970 bp fragment bol purifikovaný z agarózy. pKTBi-Vbeta 5.3 (6,75 kb) bol trávený NcoI a SalI a 5,68 kb fragment bol rovnako purifikovaný a ligovaný na 970 bp fragment za vzniku plazmidu pKBi-Vbeta 5.3 (6,64 kb).

Výsledky

Tento na leader chudobný Vbeta 5.3 konštrukt mínus dva regulačné elementy bol úspešne exprivovaný v proteáza deficientných kmeňoch. Naše pozorovania sú zhodné s pozorovaniami pre pKTBi-Vbeta 5.3. pKBi-Vbeta 5.3 bol exprivovaný v dvoch ďalších proteáz deficientných kmeňoch: SG21163 (lon', htrp') a SG21173 (lon', htrp', clp'). Výsledky sú sumarizované v Tabuľke 3. pKBi-Vbeta 5.3 dôsledne produkoval viac proteínu ako pKTBi-Vbeta 5.3 vo všetkých testovaných kmeňoch (Tabuľka 3). N-terminálne sekvenovanie exprivovaného proteínu ukázalo, že prvých 17 aminokyselinových reziduí zodpovedá očakávanej Vbeta 5.3 sekvencii a terminálny metionínový zvyšok nebol prítomný. Plazmid bol tiež demonštrovaný ako stabilný.

Rozsah predkladaného vynálezu nie je obmedzený špecifickými realizáciami tu popísanými. Samozrejme, rôzne modifikácie vynálezu k tým, ktoré sú to popísané, sa stanú zrejme odborníkom v obore z predchádzajúceho popisu a pripojených obrázkov. Takéto modifikácie sú uvažované ako patriace do rozsahu pripojených nárokov. Rôzne publikácie sú inkorporované referenciami v ich plnom znení.

Náhradný list

Zoznam sekvencií

(1) Všeobecná informácia:

- (i) Prihlasovateľ: T Cell Sciences, Inc.
- (ii) Názov vynálezu: Proteíny V regiónu antigénneho receptora T buniek a metódy ich prípravy
- (iii) Počet sekvencií: 29
- (iv) Korešpondenčná adresa:
 - (A) Adresa: T Cell Sciences, Inc.
 - (B) Ulica: 115 Fourth Avenue
 - (C) Mesto: Needham
 - (D) Štát: Massachusetts
 - (E) Krajina: Spojené štáty americké
 - (F) ZIP: 02194-2725
- (v) Počítačová čítacia forma:
 - (A) Typ média: disketa, 3,50 inch, pamäť 1,44 Mb
 - (B) Počítač: IBM PC kompatibilný
 - (C) Pracovný systém: MS-DOS
 - (D) Software: WordPerfect 6.0
- (vi) údaje o prihláške:
 - (A) Číslo prihlášky:
 - (B) Dátum podania:
 - (C) Klasifikácia:
- (vii) Dátum prioritnej prihláške:
 - (A) Číslo prihlášky: 08/181,492
 - (B) Dátum podania: 13. januára 1994
- (viii) Zástupca/agent-informácie:
 - (A) Meno: Yankwich Leon R
 - (B) Číslo registrácie: 30,237
 - (C) Referenčné/por. číslo: TCS-203-PCT (94,664-A)
- (ix) Telekomunikačné informácie:
 - (A) Telefón: 617-345-9100
 - (B) Telefax: 617-345-9111

(2) Informácie o SEQ ID NO:1:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 34 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jeden
- (D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

- (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Črta:

- (A) Meno:
- (B) Lokácia:

(xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:1:

TATAATGACT AGTCGCTGCA GCCAACCGCG GCTG

34

(2) Informácie o SEQ ID NO:2:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 23 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jeden
- (D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

- (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Črta:

- (A) Meno:
- (B) Lokácia:

(xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:2:

GTCCTAGAGT ACTGAGCGGA TAC

23

(2) Informácie o SEQ ID NO:3:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 91 párov báz

- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jeden
- (D) Topológia: lineárna
- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid
- (iii) Hypotetický:
- (iv) Anti-sense:
- (ix) Črta:
 - (A) Meno:
 - (B) Lokácia:
- (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:3:

GGCTCGAGCC TAGGCTGCAG CCCGGGGCCG CCGCGGCCGC AGGCCTTTAA
TTAGAGCTC CGGACCGCAC AATGTGGGCG CGCCCTTAAG A

50

91

(2) Informácie o SEQ ID NO:4:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 97 párov báz
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Reťazec: jeden
 - (D) Topológia: lineárna
- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid
- (iii) Hypotetický:
- (iv) Anti-sense:
- (ix) Črta:
 - (A) Meno:
 - (B) Lokácia:
- (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:4:

CTAGTCTTAA GGGCGCGCCC ACATTGTGCG GTCCGGAGCT CTTAATTAAA
GGCCTGCGGC CGCGCGCGCC CCGGGCTGCA GCCTAGGCTC GAGCCGC

50

97

(2) Informácie o SEQ ID NO:5:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 103 párov báz
 - (B) Typ: nukleová kyselina

- (C) Reťazec: jeden
- (D) Topológia: lineárna
- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid
- (iii) Hypotetický:
- (iv) Anti-sense:
- (ix) Črta:
 - (A) Meno:
 - (B) Lokácia:
- (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:5:

CTAGTAAATT CTATTCAAG GAGACAGTCA TAATGAAATA CCTATTGCCT	50
ACGGCAGCCG CTGGATTGTT ATTACTCGCT GCCCAACCAG CCATGGCCGA	100
GCT > 103	

(2) Informácie o SEQ ID NO:6:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 95 párov báz
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Reťazec: jeden
 - (D) Topológia: lineárna
- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid
- (iii) Hypotetický:
- (iv) Anti-sense:
- (ix) Črta:
 - (A) Meno:
 - (B) Lokácia:
- (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:6:

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

(2) Informácie o SEQ ID NO:7:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 105 párov báz
 - (B) Typ: nukleová kyselina

- (C) Reťazec: jeden
- (D) Topológia: lineárna
- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid
- (iii) Hypotetický:
- (iv) Anti-sense:
- (ix) Črta:
 - (A) Meno:
 - (B) Lokácia:
- (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:7:

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

(2) Informácie o SEQ ID NO:8:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 98 párov báz
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Reťazec: jeden
 - (D) Topológia: lineárna
- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid
- (iii) Hypotetický:
- (iv) Anti-sense:
- (ix) Črta:
 - (A) Meno:
 - (B) Lokácia:
- (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:8:

GTGCGTACGC	GTTAGTTGCA	ATAGAGAAGA	CGACATTGA	AGCTAGTAGG	50
AATGCTATAT	TCITTTTICAT	TATGACTGTC	TCCTTGAAAT	AGAATTTA	98

(2) Informácie o SEQ ID NO:9:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 89 párov báz
 - (B) Typ: nukleová kyselina

- (C) Reťazec: jeden
- (D) Topológia: lineárna
- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid
- (iii) Hypotetický:
- (iv) Anti-sense:
- (ix) Črta:
 - (A) Meno:
 - (B) Lokácia:
- (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:9:

CTAGTCCGGA ATTGGGCATC GATTAACTTT ATTATTAAAA ATTAAAGAGG
TATATATTAA TGTATCGATT AAATAAGGAG GAATAAATA

50

89

(2) Informácie o SEQ ID NO:10:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 76 párov báz
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Reťazec: jeden
 - (D) Topológia: lineárna
- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid
- (iii) Hypotetický:
- (iv) Anti-sense:
- (ix) Črta:
 - (A) Meno:
 - (B) Lokácia:
- (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:10:

CTCCTTATTT AATCGATACA TTAATATATA CCTCITTAAT TTTTAATAAT
AAAGTTAATC GATGCCCAAT TCCGGA

50

76

(2) Informácie o SEQ ID NO:11:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 71 párov báz
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Reťazec: jeden

- (D) Topológia: lineárna
- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid
- (iii) Hypotetický:
- (iv) Anti-sense:
- (ix) Črta:
 - (A) Meno:
 - (B) Lokácia:
- (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:11:

ATGAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCTGC
CCACCAGCC ATGGCCGAGC T 71

50

(2) Informácie o SEQ ID NO:12:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 76 párov báz
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Reťazec: jeden
 - (D) Topológia: lineárna
- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid
- (iii) Hypotetický:
- (iv) Anti-sense:
- (ix) Črta:
 - (A) Meno:
 - (B) Lokácia:
- (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:12:

CGGCCATGGC TGGTTGGGCA GCGAGTAATA ACAATCCAGC GGCTGCCGTA
GGCAATAGGT ATTTCATTAT TTATTC 76

50

(2) Informácie o SEQ ID NO:13:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 73 párov báz
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Reťazec: jeden
 - (D) Topológia: lineárna

- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid
- (iii) Hypotetický:
- (iv) Anti-sense:
- (ix) Črta:
 - (A) Meno:
 - (B) Lokácia:
- (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:13:

ATGAAAAAGA ATATAGCATT CCTACTAGCT TCAATGTTTCG TCTTCTCTAT
 TGCAACTAAC GCGTACGCAC ATT 73

50

(2) Informácie o SEQ ID NO:14:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 79 párov báz
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Reťazec: jeden
 - (D) Topológia: lineárna
- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid
- (iii) Hypotetický:
- (iv) Anti-sense:
- (ix) Črta:
 - (A) Meno:
 - (B) Lokácia:
- (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:14:

GTGCGTACGC GTTAGTTCGA ATAGAGGAGA CGACATTGA AGCTAGTAGG
 AATGCTATAT TCTTTTTCAT TATTTATTC 79

50

(2) Informácie o SEQ ID NO:15:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 33 párov báz
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Reťazec: jeden
 - (D) Topológia: lineárna
- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

- (A) Popis: syntetický oligonukleotid
- (iii) Hypotetický:
- (iv) Anti-sense:
- (ix) Črta:
 - (A) Meno:
 - (B) Lokácia:
- (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:15:

TAATTAGCCA TGGCCGGCGT AACCCATCT CCG

33

(2) Informácie o SEQ ID NO:16:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 21 párov báz
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Reťazec: jeden
 - (D) Topológia: lineárna
- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid
- (iii) Hypotetický:
- (iv) Anti-sense:
- (ix) Črta:
 - (A) Meno:
 - (B) Lokácia:
- (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:16:

CCAGTGCCAA GCTTGCATGC C

21

(2) Informácie o SEQ ID NO:17:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 - (A) Dĺžka: 34 párov báz
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Reťazec: jeden
 - (D) Topológia: lineárna
- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 - (A) Popis: syntetický oligonukleotid
- (iii) Hypotetický:
- (iv) Anti-sense:

(ix) Črta:

(A) Meno:

(B) Lokácia:

(xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:17:

GAAATTAAAG CGTACGCAGG CGTAACCCAA TCTC

34

(2) Informácie o SEQ ID NO:18:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 21 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Reťazec: jeden

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

(A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Črta:

(A) Meno:

(B) Lokácia:

(xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:18:

CCAGTGCCCA GCTTGCATGC C

21

(2) Informácie o SEQ ID NO:19:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 110 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Reťazec: jeden

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

(A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Črta:

(A) Meno:

(B) Lokácia:

(xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:19:

CTAGTCCGGA ATTGGGCATC GATTAAC TTT ATTATTAAAA ATTAAAGAGG	50
TATATATTAA TGTATCGATT AATAAGGAG GAATAACCA TGGCACATTG	100
TGCGGTCCGC	110

(2) Informácie o SEQ ID NO:20:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 110 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jeden
- (D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

(A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Črta:

(A) Meno:

(B) Lokácia:

(xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:20:

CCGGGCGGAC CGCACAATGT GCCATGGTTT ATTCCTCCTT ATTTAATCGA	50
TACATTAATA TATACCTCTT TAATTTTAA TAATAAGTT AATCGATGCC	100
CAATTCGGGA	110

(2) Informácie o SEQ ID NO:21:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 42 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jeden
- (D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

(A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Črta:

(A) Meno:

- (B) Lokácia:
 (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:21:

CTAGTAAATT ATATTTAAAG GAGGAATAAA CCATGGCACA TT

42

(2) Informácie o SEQ ID NO:22:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 (A) Dĺžka: 35 párov báz
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Reťazec: jeden
 (D) Topológia: lineárna
 (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 (A) Popis: syntetický oligonukleotid
 (iii) Hypotetický:
 (iv) Anti-sense:
 (ix) Črta:
 (A) Meno:
 (B) Lokácia:
 (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:22:

GTECCATGGT TTATTCCTCC TTAAATATA ATTTA

35

(2) Informácie o SEQ ID NO:23:

- (i) Charakteristiky sekvencie:
 (A) Dĺžka: 20 párov báz
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Reťazec: jeden
 (D) Topológia: lineárna
 (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
 (A) Popis: syntetický oligonukleotid
 (iii) Hypotetický:
 (iv) Anti-sense:
 (ix) Črta:
 (A) Meno:
 (B) Lokácia:
 (xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:23:

TATAGTCCAT GGGCGTAACC

20

(2) Informácie o SEQ ID NO:24:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 25 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jeden
- (D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

- (A) Popis: syntetický oligonukleotid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Črta:

- (A) Meno:

- (B) Lokácia:

(xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:24:

AACTTCCCGG GTATCATTA GCTGC

25

(2) Informácie o SEQ ID NO:25:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 276 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jeden
- (D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Črta:

- (A) Meno:

- (B) Lokácia:

(xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:25:

GGC GTA ACC CAA TCT CCG ACT CAC CTG ATC AAA ACG AGA

39

GGA CAG CAC GTG ACT CTG AGA TGC TCT CCT ATC TCT GGG

78

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

(2) Informácie o SEQ ID NO:26:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 276 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jeden
- (D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Črta:

(A) Meno:

(B) Lokácia:

(xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:26:

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

(2) Informácie o SEQ ID NO:27:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 92 párov báz
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: proteín

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Črta:

(A) Meno:

(B) Lokácia:

(xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:27:

Gly	Val	Thr	Gln	Ser	Pro	Thr	His	Leu	Ile	Lys	Thr	Arg	Gly	Gln	1	5	10	15
His	Val	Thr	Leu	Arg	Cys	Ser	Pro	Ile	Ser	Gly	His	Lys	Ser	Val	20	25	30	
Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Val	Leu	Gly	Gln	Gly	Pro	Gln	Phe	Ile	Phe	35	40	45	
Gln	Tyr	Tyr	Glu	Lys	Glu	Glu	Arg	Gly	Arg	Gly	Asn	Phe	Pro	Asp	50	55	60	
Arg	Phe	Ser	Ala	Arg	Gln	Phe	Pro	Asn	Tyr	Ser	Ser	Glu	Leu	Asn	65	70	75	
Val	Asn	Ala	Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Ser	Ala	Leu	Tyr	Leu	Cys	Ala	80	85	90	
Ser	Ser														92			

(2) Informácie o SEQ ID NO:28:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 27 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Reťazec: jeden

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Črta:

(A) Meno:

(B) Lokácia:

(xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:28:

ATG TAT CGA TTA AAT ARG GAG GAA TAA

27

(2) Informácie o SEQ ID NO:29:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 8 párov báz

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: peptid

(iii) Hypotetický:

(iv) Anti-sense:

(ix) Črta:

(A) Meno:

(B) Lokácia:

(xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO:29:

Met Tyr Arg Leu Asn Lys Glu Glu
1 5 8

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob produkcie kompletných rekombinantných proteínov V regiónu antigénneho receptora T buniek, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje

a) transformovanie kompetentných bakteriálnych hostiteľských buniek rekombinantným expresným vektorom obsahujúcim región kódujúci kompletný proteín V regiónu antigénneho receptora T bunky a indukovateľný bakteriálny promotor,

b) indukciu indukovateľného bakteriálneho promotora v transformovaných bakteriálnych bunkách kroku a) a

c) získanie kompletného rekombinantného proteínu V regiónu antigénneho receptora T bunky.

2. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že indukovateľný bakteriálny promotor je vybraný zo skupiny zloženej z chemicky regulovaných promotorov a termálne regulovaných promotorov.

3. Spôsob podľa nároku 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že expresný vektor ďalej obsahuje regulačnú génovú sekvenciu vybranú zo skupiny zloženej z lacI génu alebo lacI^q génu.

4. Spôsob podľa nároku 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že expresný vektor zahrnuje lacIts gén.

5. Spôsob podľa nároku 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že lacIts gén je v rovnakej orientácii ako kódujúci región pre proteín V regiónu antigénneho receptora T bunky.

6. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že bakteriálny promotor je vybraný zo skupiny zloženej z lac promotora, tac promotora a trc promotora.

7. Spôsob podľa nároku 6, v y z n a č u j ú c i s a t ý m,

že rekombinantný expresný vektor ďalej zahrnuje leader sekvenciu.

8. Spôsob podľa nároku 7, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že leader sekvencia je vybraná zo skupiny zloženej z termostabilného enterotoxínu STII leadera z *Escherichia coli* a pelB leadera z *Erwinia carotovora*.

9. Spôsob podľa nároku 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že rekombinantný expresný vektor ďalej zahrnuje leader sekvenciu odvodenú od STII leader sekvencie *E. coli* a kompetentná bakteriálna hostiteľská bunka je bunka, ktorá nenesie lacI alebo lacI^q gén.

10. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že bakteriálny hostiteľský kmeň je kmeň proteáza deficientný.

11. Spôsob podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že proteáza deficientný kmeň je selektovaný zo skupiny zloženej z SG22094, SG21163 a SG21173.

12. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že expresný vektor ďalej zahrnuje regulačné elementy g10 a mini-cistronovú sekvenciu (SEQ ID NO 28).

13. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že rekombinantný expresný vektor ďalej zahrnuje:

- a) trc promotor ako indukovateľný bakteriálny promotor
- b) ribozómové väzbové miesto
- c) transkripčný terminátor
- d) lacIts regulačnú génovú sekvenciu
- e) pBR322 zdroj replikácie
- f) gén tetracyklínovej rezistencie

14. Spôsob podľa nároku 13, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že rekombinantný expresný vektor je vybraný zo skupiny zloženej z pKTBi-Vbeta 5.3 a pKBi-Vbeta 5.3.

15. Spôsob podľa nároku 13, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že rekombinantný expresný vektor ďalej zahrnuje leader sekvenciu.

16. Spôsob podľa nároku 15, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že rekombinantný expresný vektor je vybraný zo skupiny zloženej z pK-Vbeta 5.3, pKT-Vbeta 5.3, pKTB-Vbeta 5.3 a pKB-Vbeta 5.3.

17. Expresný vektor zahrnuje indukovateľný bakteriálny promotor pod kontrolou lacIts génu, kde uvedený lacIts gén kontroluje expresiu regiónu kódujúceho pre kompletný proteín V regiónu antigénneho receptora T bunky.

18. Expresný vektor nároku 17, kde indukovateľný bakteriálny promotor je vybraný zo skupiny zloženej z lac promotora, tac promotora a trc promotora.

19. Expresný vektor nároku 17, kde indukovateľný bakteriálny promotor je trc promotor.

20. Expresný vektor nároku 19, ktorý ďalej zahrnuje leader sekvenciu.

21. Expresný vektor, ktorý zahrnuje v 5'-3' smere:

- a) trc promotor
- b) ribozómové väzbové miesto
- c) región kódujúci kompletný proteín V regiónu antigénneho receptora T buniek
- d) transkripčný terminátor
- e) lacIts regulačnú génovú sekvenciu
- f) pBR322 zdroj replikácie
- g) gén tetracyklínovej rezistencie.

22. Bakteriálna bunka transformovaná expresným vektorom podľa nároku 17.

23. Expresný vektor 17, kde uvedený vektor je vybraný zo skupiny zloženej z pK-STII-Vbeta 5.3, pKT-Vbeta 5.3, pKTB-Vbeta 5.3, pKTBi-Vbeta 5.3 a pKBi-Vbeta 5.3.

24. Kompletný proteín V regiónu antigénneho receptora T buniek produkovaných podľa nároku 13.

25. Farmaceutické kompozície, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že zahrnujú kompletný proteín V regiónu antigénneho receptora T buniek.

26. Farmaceutické kompozície nároku 25, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že proteín V regiónu antigénneho receptora je Vbeta 5.3 proteín a má vzorec: aminokyselina 1 až 92 aminokyselinovej sekvencie ID NO 27.

27. Spôsob liečby imunitných chorôb zahrnujúci podanie farmaceutickej kompozície obsahujúcej kompletný proteín V regiónu antigénneho receptora T buniek subjektu potrebusjúcemu takúto liečbu.

28. Spôsob podľa nároku 27, kde s imunitou spojenou chorobou je roztrúsená skleróza.

29. Spôsob podľa nároku 28, kde kompletný proteín V regiónu antigénneho receptora T buniek je Vbeta 5.3 a má vzorec: aminokyselina 1 až 92 aminokyselinovej sekvencie ID NO 27.

30. V podstate čistý proteín Vbeta 5.3 antigénneho receptora T buniek majúci vzorec: aminokyselina 1 až 92 aminokyselinovej sekvencie ID NO 27.

31. Použitie v podstate čistého proteínu V regiónu antigénneho receptora T buniek vo výrobe liečiv na liečenie imunitných chorôb.

32. Transformované bakteriálne bunky, ktoré produkujú aspoň 300 miligramov kompletného rekombinantného proteínu V beta antigénneho receptora T buniek na liter bunkovej kultúry.

33. Spôsob diagnostiky imunitných chorôb zahrnujúci použitie kompletného rekombinantného proteínu V regiónu antigénneho receptora T buniek na detekciu prítomnosti jednotlivých subpopulácií T buniek asociovaných s imunitnými chorobami alebo prítomnosti autoprotílátok rozoznávajúcich jednotlivé proteíny V regiónu v biologických vzorcoch od pacientov.

1/2

Obr. 1

1 GGC GTA ACC CAA TCT CCG ACT CAC CTG ATC AAA ACG AGA GGA CAG
 CCG CAT TGG GTT AGA GGC TGA CTG GAC TAG TTT TGC TCT CCT GTC
 1 Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys Thr Arg Gly Gln
 46 CAC GTG ACT CTG AGA TGC TCT CCT ATC TCT GGG CAC AAG AGT GTG
 GTG CAC TGA GAC TCT ACG AGA GGA TAG AGA CCC GTG TTC TCA CAC
 16 His Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Ile Ser Gly His Lys Ser Val
 91 TCC TGG TAC CAA CAG GTC CTG GGT CAG GGG CCC CAG TTT ATC TTT
 AGG ACC ATG GTT GTC CAG GAC CCA GTC CCC GGG GTC AAA TAG AAA
 31 Ser Trp Tyr Gln Gln Val Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe Ile Phe
 136 CAG TAT TAT GAG AAA GAA GAG AGA GGA AGA GGA AAC TTC CCT GAT
 GTC ATA ATA CTC TTT CTT CTC TCT CCT TCT CCT TTG AAG GGA CTA
 46 Gln Tyr Tyr Glu Lys Glu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Phe Pro Asp
 181 CGA TTC TCA GCT CGC CAG TTC CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG AAT
 GCT AAG AGT CGA CCG GTC AAG GGA TTG ATA TCG AGA CTC GAC TTA
 61 Arg Phe Ser Ala Arg Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn
 226 GTG AAC GCC TTG TTG CTG GGG GAC TCG GCC CTG TAT CTC TGT GCC
 CAC TTG CGG AAC AAC GAC CCC CTG AGC CGG GAC ATA GAG ACA CGG
 76 Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala
 271 AGC AGC [SEQ ID NO. 25]
 TCG TCG [SEQ ID NO. 26]
 91 Ser Ser [SEQ ID NO. 27]

Obr. 2

