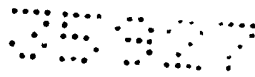


829/94

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



/99

165/1073

TUMOR NEKRÓZIS FAKTOR MUTEINEK

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, Bazel, Svájc

68218

A bejelentés napja: 1994. 03. 23.

Elsőbbsége:

1993. 03. 29.

(93810224.1) Európa

Kivonat

A találmány szerinti humán TNF-muteinek a humán p75-TNF-receptorhoz nagyobb affinitást mutatnak mint a humán p55-TNF-receptorhoz. Ezek a muteinek a vadtypusú humán TNF-hez viszonyítva, a vadtypusú aminosav-szekvencia 33, 65, 67, 75, 87, 143, 145 és/vagy 147 helyzeteinek megfelelő helyzetben legalább egy aminosav-változtatást tartalmaznak.

A találmányunk szerinti muteinek humán p75-receptor jellemzésére használhatók, továbbá a humán p55-TNF-receptorhoz szelektív kötődési affinitást mutató ismert muteinokkal együtt a humán p75-receptorhoz ill. a humán p55-receptorhoz történő kötődés által közvetített TNF funkciók megkülönböztetésére alkalmazhatók.

~~A TNFR-p75 és TNFR-p55 receptorhoz történő kötődést a 4. ábrán tüntetjük fel.~~

szell. akare: 4. ábrán tüntetjük fel!

[Handwritten signature]

829/94

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

1994

68218

Képviselő: Dr.TÓTH-URBÁN László ügyvéd, Budapest

Társképviselő: Dr.JALSOVSZKY Györgyné ügyvéd, Budapest

"A"

NSZOG

C/2 N/15/2 P

165/1073

TUMOR NEKRÓZIS FAKTOR MUTEINEK

F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, Bazel, Svájc

Feltalálók:

BANNER David	Bazel, Svájc
LESSLAUER Werner	Riehen, Svájc
LÖTSCHER Hansruedi	Möhlin, Svájc
STÜBER Dietrich	Grenzach-Wyhlen, Németország

A bejelentés napja: 1994. 03. 23.

Elsőbbsége: 1993. 03. 29. (93810224.1)

Európa

Találmányunk tumor nekrozis faktor muteinekre vonatkozik.

A tumor nekrozis faktor, vagy közelebbről tumor nekrozis faktor-alfa /a továbbiakban az egyszerűség kedvéért a "tumor nekrozis faktor" vagy "TNF" kifejezés a "TNF- α "-ra vonatkozik feltéve, hogy mást nem közlünk/ elsősorban stimulált makrofágok által termelt citokin. A tumor nekrozis faktor nem csupán különböző tumorsejtek ellen fejt ki jelentős citotoxicitást [Carswell et al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA 72, 3666-3670, /1975/], hanem közvetítőként gyulladásos folyamatokban és az immunválaszban is jelentős szerepet játszik [Bentler és Cerami áttekintése: Ann. Rev. Immunol. 7, 625-655 /1989/; Bonavista és Granger /eds./ "Tumor Necrosis Factor: Structure, Mechanism of Action, Role in Disease and Therapy, Karger, Basel /1990/]. A humán tumor nekrozis faktor-alfa /hTNF- α / primer szerkezetét egy E. coli-ban klónozott és kifejezett cDNS nukleotid szekvenciájából következtették le [Pennica et al., Nature 312, 724-729 /1984/; Marmenout et al., Europ. J. Biochem. 152, 515-522 /1985/; Wang et al., Science 228, 149-154 /1985/; Shirai et al., Nature 313, 803-806 /1985/]. A hTNF-alfa és a humán limfotoxin aminosav-szekvenciája között nagyfokú /30 %/ homológiát találtak; utóbbi anyag a gyakran tumor nekrozis faktor betának /hTNF- β / nevezett, főként ^{aktivált} limfociták által termelt citokin [Gray et al., Nature 312, 721-724 /1984/; Fiers et al., Cold Spring Harbour Symp. 51, 587-595 /1986/].

A módosított aminosav-szekvenciákat tartalmazó hTNF- α -t - un. TNF- α -muteinek - az irodalomban leírták [Yanagishi et al., Protein Engineering 3, 713-719, /1990/; Fiers: "Tumor Necrosis Factors: Structure, Function and Mechanism of Action"; Fiers et al.: Bonavista és Granger, 77-81 oldal /lásd fent/;

Goh et al., /1991/: "Structural and functional domains in human tumor necrosis factors." Prot. Engineering 4: 385-389; Kircheis et al., /1992/ "Biological activity of mutants of human tumor necrosis factor-alpha," Immunology 76: 433-438; Van Ostade et al., /1991/: "Localization of the active site of human tumor necrosis factor /hTNF/ by mutational analyses," EMBO J. 10: 827-836; Van Ostade et al., /1993/: "Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor," Nature 361: 266-269; Zhang et al., /1992/: "Site-directed mutational analysis of human tumor necrosis factor- α receptor binding site and structure-functional relationship," J. Biol. Chem. 267: 24069-24075; és Ito et al., /1991/: "Novel mutants of human tumor necrosis factor alpha," Biochim. Biophys. Acta 1096: 245-2527. Ezenkívül a TNF-alfa muteinek számos szabadalmi bejelentés tárgyát képezik /pl. WO 86/02381, WO 86/04606, WO 88/06625 sz. nemzetközi szabadalmi bejelentések; 155 549, 158 286, 168 214, 251 037 és 340 333 sz. európai közrebecsájtott európai szabadalmi bejelentések; és 3 843 534 sz. német közrebecsájtási irat7.

Az irodalomban a limfotoxin muteinjeit is leírták /lásd pl. 250 000, 314 094 és 336 383 sz. európai közrebecsájtási iratok, valamint az alábbi két publikáció: Goh et al., /1991/: "Aspartic acid 50 and tyrosine 108 are essential for receptor binding and cytotoxic activity of tumor necrosis factor beta /lymphotoxin/," Prot. Engineering 4: 785-791, és Wakabayashi et al., /1990/: "Deletion of lysine 89 enhances the cytotoxicity and the receptor binding affinity of human lymphotoxin," J. Biol. Chem. 265: 7604-7609/.

A TNF biológiai hatásait specifikus receptorok közvetítik, és pedíg a nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gél elektroforézis /SDS-PAGE/ szerint 55 kD látszólagos molekula-tömegű receptor /p55-TNF-R/ és az SDS-PAGE szerint 75 kD látszólagos molekula-tömegű receptor /p75-TNF-R/. A TNF-receptor mindkét formáját klónozták, és pedíg a p55-TNF-R receptort Loetscher és tsai [Cell. 61, 351-359 /1990/ 7] és a p75-TNF-R receptort pl. Dembic és tsai [Cytokine 2, 53-58 /1990/ 7];/mindkét receptor klónozását, továbbá pl. a 90116707.2 sz. európai szabadalmi bejelentésben ismertették/. Az utóbbi időben azt találták, hogy mindkét receptor nem csupán a TNF- α -t, hanem nagy affinitással a TNF- β -t is megköti [Schönfeld és tsai: J. Biol. Chem. 266, 3863-3869 /1991/ 7].

Az irodalomból jól ismert, hogy a TNF- α biológiai aktivitásai alapján különböző rendellenességek kezelésére alkalmazható. Így pl. a TNF- α önmagában vagy interferonnal kombinálva hatékony tumorelles szer lehet [Brouckaert és tsai: Int. J. Cancer 38, 763-769 /1986/ 7]. E vegyület szélesebbkörű gyógyászati alkalmazását azonban szisztémás toxicitása gátolja [Taguchi T. és Sohmura Y: Biotherapy 3, 177-186 /1991/ 7].

Azt találták, hogy a hTNF- α és az mTNF- α a humán p55-TNF-R és humán p75-TNF-R receptorhoz csaknem azonos aktivitással kötődik. Ugyanakkor azonban azt találták, hogy egéren a humán TNF- α /hTNF α / csak a kisebb egér TNF-receptorhoz kötődik /rágcsáló p55-TNF-R/. Egéren a hTNF- α sokkal kevésbé toxikus, mint a rágcsáló TNF- α /mTNF- α /, amely mindkét mp55-TNF-R és mp75-TNF-R egér receptorhoz kötődik. Így pl. C57Bl6 egéren az mTNF- α és hTNF- α LD₅₀ értéke 10 μ g/egér illetve 500 μ g/egér

[Brouckaert et al., Agents and Actions 26, 196-198 /1989/;
 Everaerdt, B. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 163, 378-385
 /1989/; Lewis, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2830
 /1991/; Brouckaert, P., Libert, C., Everaerdt, B. and Fiers,
 W. /1992/. "Selective species specificity of tumor necrosis
 factor for toxicity in the mouse." Lymphokine Cytokine Res.
11, 193-1967. Ezért úgy tűnik, hogy a p75-TNF-R a szisztémás
 toxicitásban jelentős szerepet tölt be.

Az irodalom szerint továbbá a burjánzásos jelzések
 humán T limfocitákban hp75-TNF-R által közvetíthetők /Gehr et al.,
 J. Immunol. 149, 911, 1992; Tartaglia et al., Proc. Natl. Acad.
 Sci. USA 88, 9292, 1991/.

A humán p75-tumor nekrosis faktor receptorhoz
 /hp75-TNF-R/ és a humán p55-tumor-nekrosis faktor receptorhoz
 /hp55-TNF-R/ szignifikáns mértékben eltérő kötődési affinitást
 mutató humán tumor nekrosis faktor muteineket a 486 908 sz.
 európai közrebocsájtási iratban irtak le. Az itt ismertetett
 hTNF muteinek a hp55-TNF-R receptorhoz való kötődési aktivitá-
 sukát megtartották, ugyanakkor azonban a hp75-TNF-R receptorhoz
 való kötődést csaknem teljesen elvesztették.

Találmányunk tárgya humán tumor nekrosis faktor
 mutein, amely a humán p75-tumor-nekrosis-faktor receptorhoz
 nagyobb kötődési affinitást mutat, mint a humán p55-tumor-
 -nekrosis-faktor-receptorhoz /a "humán tumor nekrosis faktor
 mutein" kifejezés a humán tumor nekrosis faktor mutein sóit is
 magában foglalja/.

A /vadtipusú/ humán TNF- α aminosav-szekvenciáját
 Pennica és tsai /lásd fent/ a következőképpen irták le:

szerinti muteinek előnyösen alkalmazhatók hp75-TNF-R receptor jellemzésére, és a továbbiakban ismertetésre kerülő diagnosztikai és gyógyászati területeken is kedvezően alkalmazhatók.

A muteinek a vadtypusú humán TNF- α -hoz viszonyítva, az N-terminális aminosavhoz képest a 33, 34, 65, 67, 75, 143, 145 és/vagy 147 helyzetnek megfelelő helyzetek legalább egyikében legalább egy aminosav-változtatást tartalmaznak. A fenti "megfelelő" kifejezés azt jelenti, hogy a találmányunk szerinti muteinek a vadtypusú humán TNF- α -val a megjelöltektől eltérő helyzetekben nem szükségszerűen homológok, minthogy ilyen helyzetekben a vadtypusú aminosav-szekvenciához viszonyítva törlések, beillesztések vagy helyettesítések eszközölhetők, feltéve, hogy ezek a hp75-TNF-R-hez történő kötődési affinitást lényegesen nem befolyásolják.

A fehérjék és polipeptidek olyan aminosav helyettesítései, amely a biológiai aktivitást lényegében nem változtatják meg, az irodalomból jól ismertek, ^{lásd pl.} H. Neurath and R.L. Hill: "The Proteins", Academic Press, New York /1979/, különösen a 14. oldalon levő 6. ábra. A leggyakoribb megfigyelt aminosav-helyettesítések az alábbiak: Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly és vice versa.

A muteinek előnyösen a vadtypusú szekvenciában felüntetett helyzeteknek megfelelő alábbi helyzetekben tartalmazzanak legalább egy aminosav-változtatást.

A33T
K65A
K65W
Q67K
Q67T
Q67Y
L75H
L75W
D143N
D143E
D143F
D143W
D143Y
D143V
D143V - F144L - A145S
D143N - A145R
D143V - A145S
A145R
A145D
A145G
A145H
A145K
A145F
A145S
A145T
A145W
A145Y
A145V
E146R
S147L

A fenti nomenklaturában szereplő betűk az egybetűs aminosav kódoknak megfelelően aminosavakat jelölik. A kötőjelek az egynél több aminosav-változtatásokat választják el egymástól. Minden aminosav-változtatás esetében az első betű a vadtypusú humán TNF α -ban levő aminosavat, míg a második betű a muteinben levő aminosavat jelzi. A számok a vadtypusú szekvencia azon helyzetét jelölik, amelyben a vadtypusú szekvencia a megjelölt aminosavat tartalmazza.

A variánsok közül az alábbiak hp75-TNF-R-hez különösen jó kötődési szelektivitást mutatnak.

K65W
 D143N
 D143E
 D143F
 D143W
 D143Y
 D143V
 D143V - F144L - A145S
 D143N - A145R
 D143V - A145S
 A145R
 A145H
 A145K
 A145F
 A145W
 A145Y

Különösen kedvező tulajdonságokkal rendelkeznek az alábbi variánsok:

D143N
 D143E
 D143F
 D143W
 D143Y
 D143V
 D143V - F144L - A145S
 D143N - A145R
 D143V - A145S
 A145R
 A145K
 A145F
 A145W
 A145Y

Megjegyezzük, hogy valamennyi felsorolt variáns a vadtipusú szekvencia helyzeteinek megfelelő 143 és/vagy 145 helyzetben aminosav-változtatást tartalmaz. Ezért a fenti helyzetekben eszközölt aminosav-változtatások előnyösek.

A találmányunk szerinti hTNF muteinek továbbá "linker" szekvenciák által kódolt különböző aminosav-szekvenciákat tartalmazhatnak. Ezek a szekvenciák a fent ismertetett hTNF muteinek kifejezésére használt kifejező vektorok révén keletkezhetnek.

A találmányunk szerinti hTNF muteinek továbbá olyan specifikus szekvenciákat tartalmazhatnak, amelyek nagy szelektivitással affinitás hordozóanyagokhoz kötődnek és ily módon a tisztítást elősegítik. Az ilyen szekvenciák példájaként a legalább két szomszédos hisztidin-maradékot tartalmazó szekven-

ciákat említjük meg /lásd 282 042 sz. európai közrebocsájtási irat/. Az ilyen szekvenciák nitrilotriecetsav nikkellal kelátgyantákhoz szelektíven kötődnek [Hochuli és Döbeli: Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, 748 /1987/; 253 303 sz. európai közrebocsájtási irat]. Az ilyen specifikus szekvenciákat tartalmazó hTNF muteinek a hTNF-mutein aminosav-szekvenciájának C-terminálisához vagy N-terminálisához vagy mindkét terminálisához kapcsolódhatnak.

A találmányunk szerinti hTNF muteinek különböző nehézláncú immunoglobulinokkal vagy könnyűláncú polipeptidekkel is kombinálhatók. Ez kimer hTNF mutein immunoglobulin polipeptidekhez vezet, amelyek hosszabban vivo felezési idővel rendelkezhetnek. Hosszabb in vivo felezési időket tapasztaltunk pl. olyan kimer polipeptidek esetében, amelyek az emlős immunoglobulin nehézláncú vagy könnyűláncú konstans tartományának első két részéből állnak [lásd Tranuneker és tsai: Nature 331, 84-86 /1988/; 394 827 sz. európai közrebocsájtási irat]. A hTNF muteinek bármely más peptid szekvenciával fuzionált kimer fehérjéi is előállíthatók.

A hTNF muteinek továbbá polimerekhez is kapcsolhatók, pl. 500-20.000 Dalton molekulatömegű polietilén-glikolhoz vagy polipropilén-glikolhoz /pegilezett hTNF muteinek/. Ez védett hTNF mutein kompozíciókhoz vezet, amelyek lényegében nem-immunogének lehetnek. A polimer és polipeptid összekapcsolására számos módszer ismeretes /lásd pl. 4 179 337 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás/. Ennek megfelelően találmányunk pegilezett hTNF muteinekre vagy gyógyászatiilag alkalmas sóikra is kiterjed.

A találmányunk szerinti hTNF muteineket az irodalomból jól ismert módszerekkel állíthatjuk elő [Sambrook és tsai: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. kiadás, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA /1989/7] vagy a következő bekezdések. A példákban leírt módon határozható meg, hogy az ilyen hTNF muteinek a p75-TNF-R receptorhoz szelektíven kötődnek-e vagy sem. A találmányunk szerinti hTNF muteinek alternatív módon az irodalomból ismert standard kémiai módszerekkel is szintetizálhatók; előnyösen szilárdfázisú módszereket alkalmazhatunk [lásd Merrifield módszerei: J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154 /1963/7]. Találmányunk továbbá e muteinek sóira is kiterjed. A sók előállítása önmagukban ismert módszerekkel történik.

Feltételezésünk szerint a TNF-el összefüggő betegségek és állapotok kezelésében általánosan használható az a stratégia, amely szerint a hasznos és nemkívánatos TNF- α aktivitásokat az egyik vagy másik TNF-receptorhoz kötődő vegyületek - pl. a találmányunk szerinti hTNF muteinek - felhasználásával szétválasztjuk.

Találmányunk tárgya továbbá a fentiekben leírt hTNF muteineket kódoló DNS-szekvenciák. Az ilyen szekvenciák /vagy fragmentjeik/ egyrészt a találmányunk szerinti muteinek előállításánál felhasználható közbenső termékek, másrészt a génterápiában is felhasználhatók és ezáltal egy meglévő gén kedvező hatások fellépése mellett módosítható. A szekvenciák /vagy fragmentjeik/ továbbá anti-DNS-ként is felhasználhatók, gén kifejezés szabályozására, komplementer mRNS szekvenciákhoz történő kötődés útján.

A fenti DNS-szekvenciák hTNF-t kódoló genom-vagy cDNS-szekvenciákból kiindulva, az irodalomban leírt módon alakíthatók ki /lásd: fent/, az in vitro mutagenézis ismert módszereinek alkalmazásával /lásd: pl. Sambrook és tsai., 1989/. Találmányunk továbbá a jelen találmány szerinti DNS-szekvenciákkal komplementer RNS-szekvenciákra is kiterjed, amelyet pl. cDNS szekvenciák előállítására alkalmazhatunk.

A fent említett mutagenézist többféleképpen végezhetjük el. Az egyik módszer a "véletlenszerű" mutagenézis. Ennek során nagyszámú mutánst kapunk, amelyeket megfelelő vizsgáló rendszerekben a kívánt tulajdonságokra megvizsgálunk. Másik módszer szerint az ún. "helyre irányított" mutagenézis [lásd: pl. Sambrook és tsai /1989/ 15.51-15.113]; ennek során egy adott DNS-szekvencia meghatározott helyzeteiben mutációkat végzünk el. A mutagenézis továbbá polimeráz lánc reakció segítségével is elvégezhető [lásd: pl. White et al.; Trends in Genetics 5, 185-189 /1989/ 7].

A véletlenszerűen végzett mutagenézisnél alkalmazott egyik kémiai mutagén ágens a nátrium-biszulfit, amely a citozinmaradékot uracilmaradékká alakítja és ezáltal a "C" → "T" átmenethez vezet [nukleotidok standard rövidítése; a módszer tekintetében lásd pl. Shortle és Nathans, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 2170-2174 /1978/ vagy Pine és Huang, Meth. Enzym. 154, 415-430 /1987/ 7]. Ez a mutagén ágens csak az egyszálú DNS-re hat, míg a mutált cél DNS-szekvencia kifejezése kettős-szálú plazmid vektorral történik. A mutagenézisnél és kifejező vektoroknál az újraklózás többek között ún. "phazmidok" alkalmazásával kerülhető el. Ezek vektorok, amelyek a replikáció

plazmid eredetén kívül valamely szálszerű fágból leszármaztatott replikáció eredetét is hordoznak. Az ilyen plazmidok példáulként a Stanssen és tsai által leírt [Nucleic Acids. Res. 17, 4441-4454 /1989/7] pMa- és pMc-plazmidokat említjük meg. Ezen kifejező rendszer felhasználásával ún. "hézag-duplex" szerkezetek alakíthatók ki [lásd továbbá Kramer és tsai: Nucl. Acids. Res. 12, 9441-9456 /1984/7], amelyekben csak a TNF-t kódoló szekvencia [lásd: fent/ van egyszálú konfigurációban és ezért a specifikus kémiai mutagén ágens számára hozzáférhető. A véletlenszerű mutagenézisben felhasznált "hézag-duplexek" a helyspecifikus mutagenézissel kapcsolatban Stanssen és tsai által [lásd: fent/ leírt módon építhetők fel azzal a különbséggel, hogy a /-/szál ugyanazt az aktív antibiotikum rezisztens gént tartalmazza mint a /+/szál. A hTNF α -t kódoló DNS-szekvenciában különböző restrikciós helyek felhasználásával a hézag szélessége változtatható. Az ilyen restrikciós helyes példáulként a ClaI-SaII helyeket /470 nukleotid/, BstXI-BstXI helyeket /237 nukleotid/ vagy StyI-StyI helyeket /68 nukleotid/ említjük meg. Az ilyen "hézag-duplex" összetételeket ezután növekvő koncentrációjú /4 M-ig/ biszulfittal kezelhetjük, majd számos dialízis lépésnek vethetjük alá [Shortle és Nathans /lásd: fent/ által leírt módon]. Egy megfelelő prokarióta gazdasejtet ezután az irodalomból ismert és pl. Sambrook és tsai [lásd: fent/ által leírt módszerekkel ilyen plazmidokkal transzformálhatunk. Ebben az összefüggésben "megfelelő prokarióta gazdasejtet" olyan gazdasejtet értünk, amely egy specifikus regeneráló funkciójában hiányos és ezért a replikáció alatt az uracil-maradék a DNS-ben megmarad; ez a gazdasejt továbbá a megfelelő mutált TNF kifeje-

zésére képes. Az ilyen specifikus gazdasejtek az irodalomból ismertek, pl. E. coli törzsek, mint pl. E. coli BW 313 [Kunkel T.A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488-492 /1985/7]. A keletkező klónokból screeneléssel megfelelő vizsgáló rendszerek segítségével kiválasztjuk azokat, amelyek a kívánt hTNF kifejezésére képesek. Így pl. eljárhatunk oly módon, hogy minden telepet mikrotiter-lemezen a releváns antibiotikumot tartalmazó megfelelő táptalajban inokulálunk. A sejteket lizozim hozzáadásával lizálhatjuk, majd szekvenciális fagyasztásos-felengedési ciklusokat hajtunk végre. A nukleinsavak kicsapása és centrifugálás után minden telep felülúszóját közvetlenül a megfelelő vizsgálatoknak vethetjük alá /lásd: pl. jelen szabadalmi leírás III. példája/.

A mutáció specifikus helyeit pl. restrikciós fragmens analízissel határozhatjuk meg [lásd: pl. Sambrook és tsai /lásd: fent/7]. Az ilyen fragmensek DNS-szekvenciájának meghatározásával a mutáció pontos helyzete meghatározható és ha az ilyen mutáció aminosav-cseréhez vezet, úgy az új aminosav a meghatározott DNS-szekvenciából leszarmaztatható. A DNS szekvenciálást az irodalomból ismert módszerekkel végezhetjük el, pl. T7 polimeráz felhasználásával szuperspirális DNS-en a kereskedelemben beszerezhető szekvenciáló kit segítségével /Pharmacia, Uppsala, Svédország/.

Mint már említettük, egy adott DNS-szekvencia mutálására rendelkezésre álló másik lehetőség a "hely irányított mutagenézis". Az ilyen típusú mutagenézis széleskörűen használt stratégiáját Hutchinson és Adgell [J. Virol. 8, 181 /1971/7] irták le; ennek lényege, hogy a kívánt nukleotid helyettesítést

hordozó szintetikus oligonukleotidet valamely egyszálú DNS-szekvencia azon cél-tartományába építjük be, ahol a mutációt el kívánjuk végezni [lásd: pl. Smith Annual Rev. Genet. 19, 423 /1985/; javított módszerek vonatkozásában lásd Stanssen és tsai: 2-6. hivatkozás /1989/7].

Egy ilyen előnyös módszert Stanssen és tsai /1989/ irtak le, amelynek során "hézagos duplex DNS"-t alkalmaznak a Kramer és tsai /1984/ által leírt módon [lásd: fent és Kramer és Fritz: Methods in Enzimology, /1987/, Academic Press Inc. /USA/7], azonban a mutációt tartalmazó szál kiválasztásához M13 funkcionális gének helyett antibiotikum rezisztens géneket alkalmazunk, a phasmid-technológián kívül [lásd továbbá: Stanssen és tsai /1989/, /lásd: fent/7]. E módszer előnye, hogy egymás után több mutagenézis ciklus elvégzésére képes anélkül, hogy a gént egy új mutagenézis vektorra át kellene vinni; a második mutagenézis ciklus csupán abban különbözik, hogy egy másik antibiotikum markert kell kiválasztani /Stanssen és tsai, lásd: fent/. Kontrollként a mutánsnak a vad típusú TNF-é történő hely-specifikus visszamutagenézise alkalmazható. Ezenkívül a TNF génben egy restriktációs helyet létrehozó vagy megszüntető oligonukleotid alkalmazása esetén a mutáns nem csupán a hely-irányított mutagenézishez felhasznált oligonukleotiddé történő hibridizáció útján ellenőrizhető, hanem a restriktációs hely jelenléte vagy hiánya által is. Az aminosav-szekvenciában a vad típusú aminosavak helyén bármely természetben előforduló aminosavat tartalmazó hTNF mutein készlet előállítására céljából egy oligonukleotid készletet alkalmazunk, amely a meghatározott helyzetekben minden lehetséges kodont tartalmaz.

Mint már említettük, egy adott DNS-szekvencia mutálásának további lehetősége a polimeráz lánc reakciót /PCR/ alkalmazó mutagenézis. A módszer elveit pl. White és tsai /1989/ ismertették, míg javított módszereket pl. Innis és tsai irtak le [PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press Inc. /1990/ 7.

A PCR nagymennyiségű, meghatározott hosszúságú és szekvenciájú specifikus DNS fragmens kis mennyiségű templát DNS-ből történő termelésére szolgáló in vitro módszer. A PCR a cél szekvencia ellentétes szálaihoz hibridizáló két oligonukleotid primer által szegélyezett DNS fragmens enzimes amplifikációján alapul. A primerek orientációja olyan, hogy 3' végeik egymásfelé mutatnak. A templát hővel több ciklusban végzett denaturálása, a primereknek komplementer szekvenciáikhoz történő illesztése és az így átalakított primerek DNS polimerázzal végrehajtott kiterjesztése a PCR primerek 5' végei között levő szegmens amplifikációját eredményezi. Minthogy minden primer kiterjesztett terméke egy másik primer templátjaként szolgálhat, minden ciklus lényegében megkétszerezi az előző ciklusban termelt DNS fragmens mennyiségét. Minthogy a primerek a megsokszorozott termékbe fizikailag beépülnek, s a primer 5' végei és a templát közötti hibás összeillesztések az amplifikáció hatékonyságát jelentős mértékben nem befolyásolják, a megsokszorozott szekvencia megváltoztatható és ezáltal a kívánt mutáció a megsokszorozott DNS-be beépíthető. A termofil *Thermus aquaticus* baktériumból izolált termostabil Taq DNS polimeráz felhasználásával a polimeráz denaturálódása elkerülhető; ez a denaturálódás mindezideig minden egyes denaturálási lépés után

enzim hozzáadását tette szükségessé. E fejlesztés segítségével a PCR számos egyszerű, hőmérséklet-cikluson alapuló berendezés felhasználásával automatizálható. Ezenkívül az amplifikációs reakció specifikussága oly módon növelhető, hogy a primer beillesztésnél és kiterjesztésnél magasabb hőmérsékleteket alkalmazunk. A megnövelt specifikusság a megsokszorozott termékek összkitermelését azáltal javítja, hogy a nem célzott fragmensek között az enzimekért és primerekért folyó versengést minimumra csökkenti.

Az oligonukleotidok megtervezését és szintézisét az irodalomban ismert és pl. Sambrook és tsai /1989/ által leírt módon vagy a hely-irányított mutagenézissel kapcsolatban idézett irodalmi helyek valamelyikében leírtak szerint végezhetjük el.

A találmányunk szerinti hTNF muteint kódoló DNS-szekvencia létrehozása után a kifejezést a fentiekben leírt phasmid technológiával vagy az irodalomból jólismert bármely megfelelő prokarióta vagy eukarióta kifejező rendszer felhasználásával /lásd: pl. Sambrook és tsai, lásd: fent/ végezhetjük el.

A kifejezést előnyösen prokarióta sejtekben végezhetjük el, így pl. az alábbi sejteket alkalmazhatjuk: *E. coli*, *Bacillus subtilis* stb., előnyösen *E. coli*, különösen *E. coli* K12 törzsek, pl. M15 [DZ 291, Villarejo és tsai: *J. Bacteriol.* 120, 466-474 /1974/], HB 101 [ATCC No. 33694], WK6 /Stranssen és tsai, lásd: fent/ vagy *E. coli* SG13009 [Gottesmann és tsai: *J. Bacteriol.* 148, 265-273 /1981/]. A találmányunk szerinti hTNF muteineket továbbá alacsonyabb vagy magasabb rendű eukarióta sejtekben is kifejezhetjük, így pl. élesztősejtekben /pl. *Saccharomyces*, *Pichia* stb./, szálszerű gombákban /pl. *Aspergillus* stb./ vagy sejtvonalakban /pl. kínai hörcsög petefészek-

sejtvonalakban stb./; a kifejezést előnyösen élesztősejtekben végezhetjük el [lásd: Sreekrishna és tsai: Biochem. 28, 4117-4125 /1989/; Hitzeman és tsai: Nature 293, 717-722 /1981/; 263 311 sz. európai közrebocsájtási irat 7. A találmányunk szerinti hTNF muteinek az ilyen rendszerekben intracellulárisan vagy - a gén megfelelő adaptálása után - extracellulárisan fejeződnek ki [lásd: Lermans és tsai: Gene 85, 99-108 /1989/ 7.

Az E. coli-ban történő kifejezésre alkalmas vektorokat többek között az alábbi irodalmi helyeken írták le:

[Sambrook és tsai, /lásd: fent/ vagy Fiers és tsai: "Proc. 8th Int. Biotechnology Symposium", Soc. Franc. de Microbiol., Paris, /Durand és tsai kiadó/, 680-697. oldal /1988/ 7 vagy a pDS családhoz tartozó egy vagy több specifikus vektor [Bujard és tsai: Methods in Enzymology, kiadó: Wu és Grossmann, Academic Press, Inc., 155. kötet, 416-433 /1987/; Stüber és tsai: Immunological Methods, kiadó: Lefkovits és Pernis, Academic Press, Inc., IV. kötet, 121-152 /1990/ 7, mint pl. pDS56/RBSII, SphI-TNF α /D143N, A145R/, /lásd: I.példa/ vagy pDS56/RBSII, SphI-TNF α /mutein/, /lásd: II. példa/ - aholis a "mutein" szó az 1. táblázatban felsorolt TNF α -muteinekre vonatkozik. Mint-hogy ezekkel a specifikus pDS56/RBSII plazmidokkal specifikus szabályozható promotor/operátor elemek és riboszómás megkötő helyeik révén magas szintű kifejezés érhető el, a plazmidok az E. coli sejtekben csak akkor tarthatók fenn, ha a promotor/operátor elem aktivitását a lac represszornak az operátorhoz történő kötődése represszálja. A promotor aktivitása a kívánt sejtsűrűségre IPTG hozzáadásával állítható vissza, amely a represszort inaktiválja és a promotort megtisztítja. Minthogy a legtöbb E. coli törzs nem rendelkezik az ilyen nagy kópia-

számú plazmidokban jelenlevő promotor szekvenciák funkciójának teljes represszállásához elegendő represszor molekulával, az ilyen *E. coli* törzseket / pl. *E. coli* M15 vagy SGI3009/ a specifikus pDS56/RBSII plazmidokkal történő transzformálás előtt a lac represszort kódoló valamely plazmiddal /pl. pREP 4 - lásd: 2a és 2b ábra/ transzformálni kell; ezután a plazmidok az *E. coli* sejtekben stabilan fenntarthatók. A pREP4 a lac represszor kódolásán kívül a pACYC184 plazmid [Chang és Cohen: *J. Bacteriol.* 134, 1141-1156 /1978/] egy tartományát is tartalmazza, amely a replikációhoz és a leánysejtekhez történő stabil transzmisszióhoz szükséges összes információt tartalmazza [további információk tekintetében lásd továbbá "System for high level production in *E. coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure function analysis" - Stüber és tsai: *Immunological Methods*, IV. kötet, 121-152. oldal, Lefkovits és Pernis /kiadók/, Academic Press, New York /1990/].

A gazdasejteknek vektorok által végzett, a fentiekben leírt transzformációját bármely szokásos módszerrel végrehajthatjuk [lásd: pl. Sambrook és tsai /lásd: fent/]. Prokarióta gazdasejtek /pl. *E. coli*/ esetében DNS felvételére alkalmas kompetens sejtek az exponenciális növekedési fázis után összegyűjtött, majd az ismert kalcium-kloridos módszerrel kezelt sejtekből állíthatók elő. A transzformáció a gazdasejtből történő protoplaszt képzés után vagy az irodalomból ismert és leírt más módszerekkel is elvégezhető [Sambrook és tsai /lásd: fent/]. Ennek megfelelően valamely vektor - különösen a fentiekben leírt hTNF muteint kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó, prokarióta vagy alacsonyrendű eukarióta gazdasejtekben történő kifejezésre képes

vektorok - és az ilyen vektorok által transzformált gazdasejtek - különösen prokarióta gazdasejtek, pl. E. coli vagy alacsonyrendű eukarióta gazdasejtek - szintén találmányunk tárgyát képezik.

A kívánt kifejező vektort tartalmazó gazdaszervezeteket általában a növekedés szempontjából optimális körülmények között tenyésztjük. Prokarióta gazdasejtek esetében az exponenciális növekedés végén - amikor az időegységre vonatkoztatott sejtszám-növekedés lassul - a kívánt hTNF mutein kifejezését indukáljuk, azaz a kívánt hTNF muteint kódoló DNS-t átírjuk és az átírt mRNS-t lefordítjuk. Az indukciót oly módon végezhetjük el, hogy a táptalajhoz valamely induktort vagy derepresszort adunk vagy a fizikai paramétereket módosítjuk /pl. hőmérséklet változtatás/. A találmányunk előnyös kiviteli alakjait képező kifejező vektorokban a kifejezést a lac represszor ellenőrzi. A kifejező kontroll szekvenciát izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid /IPTG/ hozzáadásával derepresszáljuk és ezáltal a kívánt hTNF mutein szintézisét indukáljuk.

A transzformált gazdasejtek által fentiek szerint termelt találmányunk szerinti hTNF muteineket a fermentációs közegből nyerhetjük ki vagy a sejtek felnyitása után és/vagy a fehérje és peptid kémiában ismert bármely megfelelő extrakciós módszerrel izolálhatjuk. Így pl. az alábbi kinyerési módszerek alkalmazhatók: ammónium-szulfátos kicsapás, dialízis, ultraszűrés, gélszűrés vagy ioncserélő kromatografálás, gél elektroforézis izoelektromos fókuszálás, affinitás kromatográfia, mint pl. immunoaffinitás kromatográfia, HPLC stb. Különösen előnyösnek bizonyultak az alábbi eljárások: ammónium-szulfátos és/vagy polietilénimines kicsapás, dialízis, affinitás kromatográfia, pl. fenil-agarózon, különösen fenil-sepharozon, vagy ioncserélő

kromatografálás, különösen MONO-Q- és/vagy MONO-S-matrixon /Pharmacia, Uppsala, Svédország/ vagy különösen a Tavernier és tsai által leirt [J. Mol. Biol. 211, 493-501 /1990/ 7 és a IV. példában leirt módszer.

Találmányunk tárgyaennek megfelelően eljárás a fentiekben meghatározott hTNF muteinek előállítására oly módon, hogy valamely a fentiekben leirt transzformált gazdasejtet, előnyösen valamely prokariota gazdasejtet, pl. E. coli sejtet vagy eukariota gazdasejtet megfelelő táptalajban tenyésztünk, a muteint a tenyészet felülúszójából vagy magából a gazdasejtből izoláljuk és a muteint kívánt esetben önmagában ismert módon pegilezzük vagy gyógyászatilag alkalmas sóvá alakítjuk.

Találmányunk továbbá a fenti eljárással előállított vegyületekre is kiterjed.

A találmányunk szerinti hTNF muteineket az jellemzi, hogy humán p75-TNF-R receptorhoz szelektív kötődési affinitást mutatnak. Ezt a tulajdonságot az irodalomból a kötődési affinitások mérésére ismert bármely módszerrel meghatározhatjuk. Így pl. a TNF és a találmányunk szerinti muteinek kötődését sejt-tenyészetekben olyan sejtek alkalmazásával határozzuk meg, amelyek a TNF-receptorok két típusát különböző mértékben fejezik ki; ilyen sejtek pl. a Hep-2 sejtek, amelyek kizárólag a humán p55-TNF-R receptort fejezik ki, vagy az U937 és HL60 sejtek, amelyek ezen kívül a humán p75-TNF-R receptort is kifejezik. [Brockhaus et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 3127-3131, /1990/; Hohmann et al., J. Biol. Chem. 264, 14927-14934, /1989/; Loetscher et al. /1990/; Dembic et al. /1990/ 7. A kötődési affinitások természetesen közvetlenül, tisztított nativ vagy rekombináns p55-TNF-R és p75-TNF-R felhasználásával, a példákban

leirt módon, vagy az ilyen receptorok megfelelő oldható analógjai alkalmazásával is meghatározhatók.

A jelen szabadalmi leírásban használt "humán p75-tumor-nekrózis-faktor-receptorhoz történő szelektív kötődési affinitás" kifejezés a két TNF-receptor tipushoz való kötődési affinitás különbségére utal.

A példákban leirt vizsgáló rendszer vonatkozásában a találmányunk szerinti mutein a hp75-TNF-R receptorhoz előnyösen szelektíven kötődik /kivánatos, hogy a vadtypusú TNF-hez hasonló mértékben/, ugyanakkor azonban a hp55-TNF-R receptorhoz való kötődését lényegében teljesen elveszti. A találmányunk szerinti specifikus hTNF mutein K_D értéke a rekombináns oldható hp55-TNF-R receptorral végzett in vitro kötődési teszt szerint - a példában megadott vizsgálati rendszer alapján - előnyösen legalább 10-szer és előnyösen legalább 10^2 -szer nagyobb mint a vadtypusú TNF- α megfelelő értéke, míg ugyanezen hTNF mutein megfelelő K_D értéke a rekombináns oldható hp75-TNF-R receptorral végzett in vitro kötődési teszt szerint legfeljebb 20-szorosa a vadtypusú TNF- α megfelelő értékének. Megjegyezzük azonban, hogy a fenti specifikus K_D értékek csupán tájékoztató jellegűek és szabadalmunk oldalmi köre szempontjából semmilyen korlátozást nem jelentenek.

A találmányunk szerinti hTNF muteineket önmagukban vagy egy vagy több további hatóanyaggal együtt orálisan, injekció vagy helyi úton felhasználásra kerülő készítmények formájában alkalmazhatjuk. A hatóanyag dózisát oly módon választjuk meg, hogy a hTNF mutein funkcióval kapcsolatos biológiai funkciót hatékonyan módosítsa.

Találmányunk tárgya továbbá gyógyászati készítmény, amely találmányunk szerinti hTNF muteineket és megfelelő inert

gyógyászati hordozóanyagokat tartalmaz. Bármely szokásos gyógyászati hordozóanyag felhasználható. E célra enterális, perkutáns vagy parenterális adagolásra alkalmas, szerves vagy szervetlen hordozóanyagok alkalmazhatók, pl. viz, zselatin, gumiarábikum, laktóz, keményítő, magnézium-sztearát, talkum, növényi olajok, polialkilénglikolok, vazelin stb. A találmányunk szerinti gyógyászati készítmények további hatóanyagokat is tartalmazhatnak. A készítmények ezenkívül más adalékanyagokat is tartalmazhatnak, pl. izesítő-, tartósító-, stabilizáló-, emulgeálószeret, puffereket stb. A készítmények a gyógyszergyártásnál használatos adalékanyagokat tartalmazhatnak.

A találmányunk szerinti gyógyászati készítmények bármely szokásos formában előállíthatók, pl.

- a/ orális adagolásra szolgáló szilárd formák, pl. tabletták, kapszulák, pilulák, porok, granulák stb.;
- b/ orális adagolásra szolgáló folyékony formák, pl. oldatok, szirupok, szuszpenziók, elixírek stb.;
- c/ parenterális adagolásra szolgáló készítmények, pl. steril oldatok, szuszpenziók vagy emulziók; és
- d/ helyi alkalmazásra szolgáló formák, pl. oldatok, szuszpenziók, kenőcsök, krémek, gélek, mikronizált porok, aeroszolok stb.

A gyógyászati készítmények sterilizálhatók és adjuvánsokat /pl. tartósító-, stabilizáló-, nedvesítő-, emulgeálószeret, az ozmózisnyomás változását előidéző sók és/vagy pufferek/ tartalmazhatnak.

A parenterális adagolásra szolgáló készítmények intravénásan vagy intramuszkulárisan befecskendezhető infúziós vagy injekciós oldatok lehetnek. Ezek a készítmények további gyógyá-

vagy az endotéliumban levő specifikus gének induktora/ a gazdaszervezetnek fertőzésekkel vagy sérülésekkel szemben kifejtett védekezésében játszik szerepet. A TNF erős szisztémás toxicitást is mutat; a bakteriaemia káros hatásait és a bakteriális meningitis okozta szeptikus sokkot nagy mértékben endogén citokinek közvetítik és ezek között a TNF korai és fontos szerepet tölt be. Ezenkívül a TNF közvetlen citotoxikus aktivitásával szemben sok sejt és sejtvonal érzékeny. Állatkísérletek tanúsága szerint a TNF tumorelles hatásában különböző szisztémás hatások és celluláris toxicitás feltehetően kombinálódnak.

A fenti tények reális alapot szolgáltatnak a találmányunk szerinti hTNF muteineket felhasználó új gyógyászati stratégiák kidolgozásához. Ezek során a sok különböző hTNF aktivitás szétválasztásával a nemkívánatos toxikus hatásokat a kívánt aktivitásoktól különválasztjuk oly módon, hogy a két hTNF receptor típus közül csak az egyiket aktiváljuk /ellentétben a vadtypusú hTNF-el, amely mindkettőt megköti és aktiválja/. A találmányunk szerinti hTNF muteinek potenciális felhasználása nem korlátozódik a rákterápiára. A 75kDa TNF receptor típusú specifikus gyógyászati hatóanyagok /mint pl. a találmányunk szerinti hTNF muteinek/ minden olyan betegség kezeléséhez kedvezően alkalmazhatók, amelyben a TNF gazdaszervezet védekező faktorként bakteriális fertőzésekben [lásd: pl. Kindler, V. et al., CELL 56, 731-740 /1989/; Nakano, Y. et al., J. Immunol. 144, 1935, /1990/] vagy gyulladásokban közvetítőként jótékony szerepet játszik. Ezenkívül a TNF- α zsirsejtekre és egész állatokra bizonyos katabolikus hatást fejt ki és ezért a cachexiában játszik szerepet [Beutler, B. és Cerami, /lásd fent/; Hotamisligil et

al., Science 259, 87 1993_7 és ezért a találmányunk szerinti TNF muteinek elhizás kezelésére alkalmazhatók. Azt találtuk továbbá, hogy a TNF- α az inzulin által serkentett perifériás glükóz-hasznosítás mértékét közömbösíti /Hotamisligil és tsai, lásd: fent/. A TNF- α elhizással összefüggő inzulin-rezisztenciában kifejtett fenti feltételezett szerepe a cachexiában játszott lehetséges hatásával a két TNF receptor rendszer biológiai hatásaiban jelentkező dóziszfüggő különbségek és a két receptor rendszer különböző szerepe által kiegyenlíthető és ez vadtipusú TNF-inhibitorok jelenlétében vagy nélkülük, receptor-típusú specifikus agonisták alkalmazásával eredményesen kihasználható. Még a túlzott mértékű TNF felszabadulás által okozott toxikus aktivitások által jellemzett betegségek /pl. szeptikus sokk vagy bakteriális meningitis/ is kedvezően kezelhetők TNF receptor specifikus agonistákkal /pl. a találmányunk szerinti muteinokkal/ önmagukban vagy vadtipusú TNF antagonistákkal képezett kombinációikkal.

Az irodalomban tömör összefoglalást közöltek a TNF várható szerepére olyan új terápiás területeken, ahol a TNF-receptor típusú specifikus agonisták a sok különböző TNF aktivitás közül csupán néhányat indítanak be és ez a vadtipusú TNF-el összehasonlítva várhatóan jelentős előnyöket hoz majd. /Tumor Necrosis Factors, The Molecules and their Emerging Role in Medicine, B. Beutler, ed., Raven Press, 1992, ISBN 0-88167-852-X/. Ide tartoznak a TNF aktivitások az alábbi területeken: endotheliás sejt homosztatikus tulajdonságok és neutrofil adhézió modulálása, szövet-iskémia és reperfüziós sérülés, osteoblasztok és osteoclastok csont reszorpcióban, továbbá növekedési faktorként sok sejtben általában és hematopoiesisben, valamint metabolikus és táp-


láló hatások. A TNF limfokin-aktivált killer /LAK/ sejtek képze-
sében növekedés/differenciálás faktorként vesz részt és úgy tűnik,
hogy ez a TNF tumorelleses aktivitásában szerepet játszik.


Ennek megfelelően találmányunk a fentiekben leirt, ta-
lálalmányunk szerinti hTNF-muteinekre vagy gyógyászatiilag alkalmas
sóikra is kiterjed.


Valamennyi fenti aktivitás más rekombináns citokinekkal
/pl. gamma-interferon/ való együttes alkalmazás esetén erősíthető
vagy módosítható.


Találmányunk további részleteit az alábbi példákban is-
mertetjük, a kísérő rajzokra hivatkozva.


Az alábbi rövidítésekét és szimbólumokat alkalmazzuk:
B, E, H, S, Xb és X a BglI, EcoRI, HindIII, Sall, XbaI illetve
XhoI restrikiós enzimek hasítási helyeit jelölik.


 jelentése a N25OPSN25OP29 szabályozható promotor/operátor
elem;

 jelentése a RBSII, SphI szintetikus riboszómás kötődési
hely;

 jelentése a TNF- α /TNF- α /, beta-laktamáz /bla/, kloramfenikol
acetil transzferáz /cat/, lac represszor /lacI/ és neomicin
foszfo-transzferáz /neo/ génjei;

 jelentése a fág lambda t₀ transzkripció terminátora /t₀/
és az E. coli rrnB operon T1 /T1/;

 jelentése a pBR322 és pREP4 /repl/ plazmid replikációs tar-
tományai;

 jelentése a N25OPSN25OP29 és RBSII, SphI által ellenőrzött
kódoló tartomány.

Az 1a. ábrán a pDS56/RBSII, SphI-TNF- α plazmid semati-
kus rajzát tüntetjük fel.

Az 1b. ábra a pDS56/RBSII, SphI-TNF- α /SEQ ID No.1/ plazmid teljes nukleotid szekvenciáját tartalmazza. Ebben a szekvenciában a restriktációs enzimeknek az 1a. ábrán feltüntetett felismerő szekvenciáit megjelöltük. A bemutatott aminosav-szekvencia az érett TNF- α /157 aminosav; SEQ ID No.1 és 2/ hárombetűs kódban feltüntetett aminosav-szekvenciája.

A 2a. ábrán a pREP4 plazmid sematikus rajzát tüntetjük fel.

A 2b. ábra a pREP4 /SEQ ID No.3/ plazmid teljes nukleotid szekvenciáját tartalmazza. Ebben a szekvenciában a restriktációs enzimeknek a 2a. ábrán feltüntetett felismerő szekvenciáit bejelöltük /lásd továbbá 486908 sz. európai szabadalmi leírás 261-263 ábrái/.

A 3. ábrán a TNF- α /D143N, A145R/ TNF- α muteint kódoló EcoRI-HindIII fragmens készítését tüntetjük fel.

A 4. ábrán humán típusú TNF- α és D143N, A145R és D143N-A145R muteineknek humán TNFRp75 és TNFRp55 receptorokhoz történő kompetitív kötődését tüntetjük fel. Rekombináns humán TNFRp75-h γ 3 fúziós fehérjével /felső rész/ és rekombináns humán TNFRp55-h γ 3 fúziós fehérjével /alsó rész/ bevont 96-mélyedéses mikrotiter lemezeket radioaktív jelzett humán TNF- α -val inkubálunk, különböző koncentrációjú jelzetlen vadtypusú TNF- α , D143N, A145R vagy D143N-A145R mutein jelenlétében. A szobahőmérsékleten 3 óra alatt megkötött radioaktivitást gamma-számlálóban számláljuk.

Találmányunk további részleteit az alábbi példákban ismertetjük, anélkül, hogy az oltalmi kört a példákban korlátoznánk. A szilárd anyagokra szilárd keverékekben, folyadékokra folyadék-elegyekben és szilárd anyagokra folyadékokban megadott százalékos értékek tömeg/tömeg, térfogat/térfogat illetve

tömeg/térfogat %-ban értendők, feltéve, hogy mást nem közlünk.

I. példa

TNF- α /D143N-A145R/ előállítás

A pDS56/RBSII, SphI-TNF- α plazmid

A pDS56/RBSII, SphI-TNF- α humán TNF- α kifejezési plazmid /lásd 1. ábra/ a találmányunk szerinti különböző TNF- α mutainek előállításánál felhasznált TNF- α gén forrás. A transzformált [pREP4;pDS56/RBSII, SphI-TNF- α] E. coli M15 törzset a "Mikroorganizmusok Szabadalmi Célokra Történő Deponálásának Nemzetközi Elismerésére" irányuló Budapesti Szerződés értelmében a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH /DSM/, Braunschweig, Németország törzstenyészetnél 1991. szeptember 8-án DSM 6713 számon helyeztük letétbe.

A TNF- α gén mutagenézise PCR felhasználásával

A pDS56/RBSII, SphI-TNF- α /1. ábra/ plazmiddal mint templát DNS-sel, Perkin-Elmer Cetus GeneAmp^R DNS ampfikációs reagens kit felhasználásával, AmpliTaq^R rekombináns Taq DNS polimeráz /lásd 3. ábra/ felhasználásával két PCR reakciót végzünk el.

Az I. reakciót az alábbi primerekkel végezzük el: 17/F [5'-GGCGTATCACGAGGCCCTTTCG-3' /SEQ ID No.4/; a 17/F primer a pDS56/RBSII, SphI-TNF- α plazmid 3949-3970 nukleotidjeit tartalmazza 7, és a 46/M12 [5'-GCGAAAGTTGAGATAGTCGGGCCGATTG-3' /SEQ ID No.5/; a 46/M12 primer a pDS56/RBSII, SphI-TNF- α plazmid 552-525 nukleotidjeivel komplementer nukleotideket tartalmaz; a mutált bázisokat aláhúztuk 7.

A II. reakciót az alábbi primerekkel végezzük el:

29/MR2 \lceil 5'-GAGTCTGGGCAGGTCTACTTTG-3' /SEQ ID No.6/ ; a 29/MR1 primer a pDS56/RBSII, SphI-TNF- α plazmid 553-574 nukleotidjeit tartalmazza 7, és a 17/O \lceil 5'-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3' /SEQ ID No.7/; a 17/O primer a pDS56/RBSII, SphI-TNF- α plazmid 748-727 nukleotidjeivel komplementer nukleotideket tartalmaz 7.

Egy tipikus kísérletben 10 μ l templát DNS-t /10 ng/, 5-5 μ l primert /mindkét primerből 100 pmól/, 16 μ l dNTP keveréket /1,25 mM dATP, dGTP, dCTP és dTTP/ 10 μ l 10x reakciópuffert /100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ és 0,1 % zselatin/ 10 μ l /5 egység/ AmpliTaq^R DNS polimerázt és 53 μ l vizet Eppendorf-csőben összekeverünk és 80 ml ásványolajat /Perkin-Elmer Cetus/ rétegezzük föléje. A csöveket DNS termikus ciklus berendezésbe /TRIO-Thermoblock Biometra/ visszük át és 1 percen át 94 °C-on tartjuk, majd 35 ciklust végzünk el, amelyek során a DNS-t megolvasztjuk /1 percen át 94 °C-on/, a primereket összekapcsoljuk /1 percen át 50 °C-on/ és a primereket kiterjesztjük /3 percen át 72 °C-on/. Ezután további 2 percen át 72 °C-on tartjuk, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékletre hűtjük és kloroformmal extraháljuk. A vizes fázisban levő DNS-t etanollal kicsapjuk és 6 %-os poliakrilamid gélben /Sambrook és tsai, 1989/ elektroforézisnek vetjük alá. A DNS-t etidium-bromiddal megfestjük, a I. és II. fragmenst /lásd 3. ábra/ a gélről izoláljuk és tisztítjuk /Sambrook és tsai 1989/.

A TNF- α /Dl43N-A145R/ kódolására szolgáló DNS fragmens előállítására

A I. és II. fragmenst enzimatikusan foszforilezzük, majd egymással ligáljuk /Sambrook és tsai 1989/. A ligázt hővel inaktiváljuk, EcoRI és HindIII restriktív enzimekkel emésztjük,

majd a DNS-t 6 %-os poliakrilamid gélben elektroforézisnek vetjük alá. A DNS-t ethidium-bromiddal megfestjük, majd az EcoRI-HindIII A fragmenst /lásd: 3. ábra/ a gélről izoláljuk és tisztítjuk /lásd fent/.

A TNF- α /Dl43N-Al45R/ kódolására szolgáló plazmid előállítás

Az EcoRI-HindIII A fragmenst standard módszerekkel /Sambrook és tsai 1989/ EcoRI-HindIII nyitott pDS56/RBSII, SphI-TNF- α plazmidba illesztjük be, a pDS56/RBSII, SphI-TNF- α /Dl43N-Al45R/ plazmid kialakítása közben. A DNS plazmidot elkészítjük /Birnbom és tsai 1979/ és a TNF- α muteint kódoló tartományt a kettős-szálú DNS szekvencia meghatározásával azonosítjuk /Sambrook és tsai 1989/.

TNF- α /Dl43N-Al45R/ termelése

A pDS56/RBSII, SphI-TNF- α /Dl43A-Al45R/ plazmidot standard módszerekkel /lásd fent/ pREP4 plazmidot tartalmazó E. coli M15 sejtekben transzformáljuk. A transzformált sejteket 37 °C-on 100 mg/l ampicillint és 25 mg/l kanamicint tartalmazó LB táptalajban tenyésztjük. Ezután 600 nm optikai sűrűség mellett kb. 0,7 - 1,0 IPTG-t adunk hozzá, 2 mM végső koncentrációig. Ezután további 2,5 - 5 órán át 37 °C-on tartjuk, majd a sejteket centrifugálással learatjuk.

II. példa

További TNF- α muteinek előállítása

A I. táblázatban felsorolt további TNF- α muteineket az I. példában a TNF- α /Dl43N-Al45R/ előállítására megadott rész-

letes eljárás szerint készítjük el. A kapott, a pDS56/RBSII, SphI-TNF- α /D143N-A145R/ plazmiddal analóg kifejezési plazmidok elnevezése: pDS56/RBSII, SphI-TNF- α /mutein/; ahol a "mutein" kifejezés az I. táblázatban felsorolt TNF- α muteineket jelenti. Ezek a plazmidok a TNF- α muteineket kódoló tartományokat tartalmaznak, amelyekben a pDS56/RBSII, SphI-TNF- α plazmidban levő kodonokat a fenti muteineket kódoló kodonok helyettesítik /lásd: 1. táblázat/.

III. példa

Humán TNF- α muteinek receptor típusú specifikus kötődési aktivitásának meghatározása E. coli lizátumokban

E. coli lizátumok előállítása

Az I. és II. példában leírt módon transzformált és indukált E. coli sejtekből készített szuszpenziókat /10 ml/ percenként 4.000 fordulat mellett 10 percen át centrifugálunk és 0,9 ml lizis pufferben /10 mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM EDTA, 2 mM PMSF, 10 mM benzamidin, 200 egység/ml aprotinin és 0,1 mg/ml lizozin/ újraszuszpendálunk. Ezután szobahőmérsékleten 20 percen át inkubáljuk, majd 50 μ l 1 M MgCl₂-t, 20 μ l 5 mg/ml DNaseI-t, 50 μ l 5 M NaCl-t és 50 μ l 10 %-os NP-40-t adunk hozzá és az elegyet szobahőmérsékleten további 15 percen át inkubáljuk. A lizátumot percenkénti 13.000 fordulat mellett 5 percen át centrifugáljuk, majd 0,5 ml ily módon derített lizátumot ammónium-szulfátos lecsapásnak vetünk alá /25 % - 70 % vágás/. A 70 %-os ammónium-szulfát pelletet 0,2 ml PBS-ben oldjuk és a rekombináns fehérjék jelenlétét és hozzávetőleges mennyiségét nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid-gél /SDS-PAGE/ elektroforézissel meghatározzuk.

Szilárd fázisú radioligand kompetitív megkötési vizsgálat

96-mélyedékes mikrotiter lemezekre rekombináns humán TNFR-p75-h γ 3 és TNFR-p55-h γ 3 fúziós fehérjéket viszünk fel /a receptor extracelluláris része fuzionál a humán IgG3 Fc részével/, 0,3 μ g/ml illetve 0,1 μ g/ml koncentrációban, foszfáttal pufferolt konyhasó-oldatban \square PBS, 100 μ l/mélyedés, egy éjjelen át 4 °C-on \square , \square Loetscher, H. et al. J. Biol. Chem. 266, 18324-18329 /1991/; Lesslauer, W. et al. Eur. J. Immunol. 21, 2883-2886 /1991/ \square . Ezután blokkoló pufferrel /50 mM Tris pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,02 % NaN₃, 1 % zsirmentesített tejpor/ blokkoljuk, majd a mikrotiter lemezt PBS-el mossuk és 0,1 % zsirmentesített tejporthoz tartalmazó blokkoló pufferben 10 ng/ml humán vad-típusú ¹²⁵I-TNF- α -al és E. coli lizátumok változó hígításaival /10⁻² - 10⁻⁷; tizszeres sorozat hígítás/ inkubáljuk. A TNF- α -t jodogén módszerrel /Pierce Chemical Company/ kb. 10-30 μ Ci/ μ g fajlagos aktivitással jelezzük. A térfogat 100 μ l/mélyedés és minden lizátumhígítást kétszer vagy háromszor határozzunk meg. Az elegyeket szobahőmérsékleten 3 órán át tartjuk, majd a mélyedéseket PBS-el alaposan mossuk és γ -számlálóban számláljuk. A fenti muteineket tartalmazó lizátumokkal kapott eredményeket a 2. táblázatban tüntetjük fel.

IV. példa

Humán TNF- α muteinek tisztítása

Az I. és II. példában leírt módon transzformált és indukált E. coli sejtek egy éjszakás tenyészetét /1 liter/ centrifugálással összegyűjtjük és 20 ml pufferben /50 mM Trisz pH 7,2, 200 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 5 % glicerin/ újraszuszpendál-

juk. A sejteket francia présen 20.000 psi nyomáson vagy Branson S sugárzóval /Model 450, 2x2 perc maximális teljesítménnyel, jégen/ végzett besugárzással feltörjük. Ezután centrifugálással /70.000 g, 30 perc, 4 °C/ derítjük, a mintákat 20 mM Tris-HCl-el /pH 9,0/ szemben egy éjjelen át 4 °C-on dializáljuk, majd a fenti pufferrel kiegyensúlyozott Q-Sepharose oszlopra /Pharmacia, 2,6 x 15 cm/ felvisszük. A fehérjéket lineáris nátrium-klorid gradiens szerint /0-400 mM, 20 mM pH 9,0 értékű Tris-ben/ 1 ml/perc átfolyási sebességgel eluáljuk. Az eluátumból 5 ml-es frakciókat gyűjtünk össze, és a TNF fehérjék jelenlétét SDS-PAGE analízissel meghatározzuk. A pozitív frakciókat összegyűjtjük, 20 mM 2-morfolino-etánszulfonsavval /MES/ szemben dializáljuk /pH 6,0/ és 20 mM MES-el /pH 6,0/ kiegyensúlyozott MonoS oszlopra /HR 5/5, LKB-Pharmacia/ felvisszük. A fehérjéket lineáris nátrium-klorid gradiens szerint /0-400 mM, 20 mM MES-ben pH 6,0/ eluáljuk, 0,5 ml/perc átfolyási sebesség mellett. A különböző TNF- α muteineket 250 mM és 350 mM nátrium-klorid között elektroforetikusan tiszta fehérjék formájában eluáljuk. Ezután PBS-el szemben dializáljuk, majd a fehérjekoncentrációt BCA fehérje vizsgálat /Pierce Chemical Company/ segítségével meghatározzuk; standardként vad-típusú humán TNF- α -t alkalmazunk. A fehérjekoncentrációt 280 nM mellett végzett abszorpció méréssel is meghatározzuk.

V. példa

Tisztított vad típusú TNF- α és muteinek kompetitív kötődése rekombináns humán TNFR-p75 és TNFR-p55 receptorhoz

A kompetitív kötődési teszt elvégzése céljából tisztított muteineket alkalmazunk és mikrotiter lemezeket a III. példá-

ban leírt módon rekombináns humán TNFR-p75-h β és TNFR-p55-h β fúziós fehérjékkel vonunk be. Blokkoló pufferrel /50 mM Tris pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,02 % NaN₃, 1 % zsirmentesített tejpor/ történő blokkolás után a mikrotiter lemezt PBS-el mossuk, és 0,1 % zsirmentesített tejporthoz tartalmazó blokkoló pufferben 10 ng/ml humán vadtypusú ¹²⁵I-TNF- α -val és jelzetlen vadtypusú TNF- α vagy a muteinek különböző koncentrációival $10^2 - 10^{-5}$ μ g/ml; tízszeres sorozat higitás 7 inkubáljuk. A TNF- α -t jodogén módszerrel /Pierce Chemical Company/ kb. 10-30 uCi/ μ g fajlagos aktivitással jelezzük. A térfogat 100 μ l/mélyedés és minden koncentrációval két vagy három meghatározást végzünk. Az elegyeket szobahőmérsékleten 3 órán át állni hagyjuk, majd a mélyedéseket PBS-el alaposan mossuk és γ -számlálóban számláljuk.

A fenti muteinekre kapott eredményeket a 3. táblázatban tüntetjük fel és a 4. ábrán mutatjuk be.

1. táblázat

A muteinekben levő új aminosavak kódolására felhasznált kodonok

Mutein	Uj kodon
N19D	GAC
Q21S	TCT
L29S ^a	TCC
L29S-R32W	TCC-TGG
L29S-R32W-S86T	TCC-TGG-ACC
L29S-S86T	TCC-ACC
N30T	ACC
R31E	GAG
R31K	AAG
R31N-R32T	AAC-ACT
R31N-R32T-N34S	AAC-ACT-AGT
R31N-R32T-S86T	AAC-ACT-ACC
R31E-S86T	GAG-ACC
R32W ^a	TGG
R32W-S86T	TGG-ACC
A33D	GAC

A33T	ACC
N34R	CGT
N34D	GAC
N34C	TGT
N34Q	CAA
N34E	GAA
N34G	GGT
N34H	CAC
N34I	ATT
N34M	ATG
N34F	TTT
N34P	CCT
N34T	ACT
N34Y	TAT
N34Y	TAC
N34V	GTT
K65A	GCA
K65W	TGG
Q67K	AAA
Q67T	ACA
Q67Y	TAC
H73Q	CAA
H73T	ACT
L75R	CGT
L75H	CAC

L75W	TGG
S86D	GAC
S86T	ACC
Y87Q	CAG
Y87Q-Q88Δ	CAG-
Y87E	GAA
Y87G	GGT
Y87L	CTG
Y87K	AAA
Y87F	TTC
Y87T	ACC
Y87T-E104G	ACC-GGG
N92R	CGT
I97K	AAG
I97Y	TAC
S99A	GCA
S99Y	TAC
Y115W	TGG
D143N	AAC
D143E	GAA
D143F	TTC
D143W	TGG

D143Y	TAC
D143V	GTC
D143V-F144L-A145S	GTC-CTG-TCC
D143N-A145R	AAC-CGC
D143V-A145S	GTC-TCC
F144R	CGT
F144D	GAT
F144G	GGT
F144L	TTG
F144W	TGG
F144Y	TAC
A145R	CGC
A145D	GAT
A145G	GGT
A145H	CAC
A145K	AAA
A145F	TTT
A145S	TCC
A145T	ACA
A145W	TGG
A145Y	TAC
A145V	GTT
E146R	CGT
S147N	AAC
S147L	CTG

^a a L29S és R32W muteineket dr. W. Fiers laboratóriumában /Ghenti Egyetem/ készítették el /lásd továbbá EP 486 908 sz. európai szabadalmi leírás/.

2. táblázatHumán TNF- α muteinek kötődése TNFR-p55 és TNFR-p75 receptorhoz

Mutein	^{125}I -TNF- α kötődés 50 %-os gátlásához szükséges E. coli lizátum higitás, ID ₅₀ ^{a/}		ID ₅₀ TNFR-p55 ^{b/}
	TNFR-p55	TNFR-p75	ID ₅₀ TNFR-p75
	-szoros	-szoros	
vadtípus ^{c/}	14'260	14'140	1
N19D	5'000	5'000	1
Q21S	2'500	2'500	1
L29S ^{c) e)}	2'980	<100	>29.8
L29S-R32W	5'000	<<100	>>50
L29S-R32W-S86T	2'500	<<100	>>25
L29S-S86T	200	<<100	>>2
N30T	2'860	2'500	1.1

R31E <i>c)</i>	3'470	180	19.3
R31K	3'330	3'330	1
R31N-R32T <i>c)</i>	3'260	<100	>32.6
R31N-R32T-N34S	<<100	<<100	1
R31N-R32T-S86T	500	<100	>5
R31E-S86T	2'000	<<100	>>20
R32W <i>c) e)</i>	8'780	<100	>87.8
R32W-S86T	3'330	<<100	>>33.3
A33D	<100	<<100	>1
A33T	1'110	1'250	0.9
N34R <i>d)</i>	<100	<<100	>1
N34D	250	<100	>2.5
N34C	250	<100	>2.5
N34Q	<100	<<100	>1
N34E	330	<<100	>>3.3
N34G	330	<100	>3.3
N34H	670	<100	>6.7
N34I <i>d)</i>	200	<100	>2
N34M <i>d)</i>	<100	<<100	>1
N34F <i>d)</i>	100	<100	>1
N34P	<100	<<100	>1

N34T	1'000	<100	>10
N34Y <i>d)</i>	<100	<<100	>1
N34Y <i>d)</i>	<100	<<100	>1
N34V <i>d)</i>	<100	<<100	>1
K65A	20'000	33'330	0.6
K65W <i>d)</i>	500	3'330	0.2
Q67K	25'000	50'000	0.5
Q67T	25'000	33'330	0.75
Q67Y	20'000	33'330	0.6
H73Q	10'000	10'000	1
H73T	2'000	2'000	1
L75R	<100	<100	1
L75H	1'670	2'500	0.7
L75W	220	330	0.7
S86D	6'670	1'000	6.7
S86T	10'000	<100	>100
Y87Q	<<100	<<100	1
Y87Q-Q88Δ	<<100	<<100	1
Y87E	<100	<<100	>1

Y87G	<<100	<<100	1
Y87L	<<100	<<100	1
Y87K	<<100	<<100	1
Y87F	200	<100	>2
Y87T	<<100	<<100	1
Y87T-E104G	<100	<100	1
N92R	5'000	1'250	4
I97K	143	<100	>1.4
I97Y	2'500	330	7.6
S99A	6'670	6'670	1
S99Y	<100	<100	1
Y115W	2'220	2'220	1
D143N <i>c)</i>	<<100	330	<<0.3
D143E	<100	330	<0.3
D143F	<<100	250	<<0.4
D143W	<<100	100	<<1
D143Y <i>c)</i>	<<100	1'330	<<0.08
D143V	<<100	<100	<1
D143V-F144L-A145S	<<100	<100	<1

D143N-A145R <i>d)</i>	<<100	125	<<0.8
D143V-A145S <i>c)</i>	<<100	200	<<0.5
F144R	2'500	330	7.6
F144D	5'000	330	15.2
F144G	2'500	2'000	1.2
F144L	5'000	5'000	1
F144W	400	180	2.2
F144Y	2'860	2'860	1
A145R	<100	3'330	<0.03
A145D	5'000	6'670	0.7
A145G	2'500	6'670	0.4
A145H	330	1'670	0.2
A145K	<100	1'820	<0.05
A145F <i>c)</i>	240	6'000	0.04
A145S	14'290	25'000	0.6
A145T	5'000	6'670	0.7
A145W <i>d)</i>	<<100	<100	<1
A145Y	1'670	11'110	0.1
A145V	1'000	2'000	0.5
E146R	6'670	<100	>67
S147N	10'000	10'000	1
S147L	2'000	3'330	0.6

A humán vadtypusú TNF- α -t és a muteineket fejezzük ki és a baktériumok lizálásával extraháljuk. A vadtypusú és mutáns TNF- α szelektív receptor kötődési aktívását szilárdfázisú radioligand kötődési vizsgálattal határozzuk meg. A humán vadtypusú ^{125}I -TNF- α -nak immobilizált humán TNFR-p75 és TNFR-p55 receptorokhoz történő kompetitív kötődési gátlásának vizsgálatához E. coli lizátumok különböző higitásait / 10^{-2} - 10^{-7} ; tízszeres sorozathigitások/ alkalmazzuk. Az ID_{50} értékeket /50 %-os gátláshoz szükséges higitás/ oly módon határozzuk meg, hogy a kötődés gátlását a lizátum higitásával szemben ábrázoljuk. Minthogy a rekombináns fehérjék koncentrációja a lizátumban SDS-PAGE analízis szerint 0,05 és 1 mg/ml közötti érték, az abszolút ID_{50} értékek nem tekinthetők relevánsnak. A receptor szelektivitást oly módon fejezzük ki, hogy az adott mutein TNFR-p75 és TNFR-p55 receptorokkal szemben mutatott ID_{50} értékeit közvetlenül összehasonlítjuk.

a/ "<" jelzés azt jelenti, hogy az érték a megadott számnál kisebb /jelen esetben a ^{125}I -TNF- α -kötődés gátlása mérhető, azonban az 50 %-os gátlást a legalacsonyabb vizsgált higitásban - 1:100 - nem éri el/;

"<<" jelzés azt jelenti, hogy az érték a megadott számnál lényegesen kisebb /jelen esetben a legalacsonyabb vizsgált higitásban - 1:100 - mérhető gátlást nem tapasztaltunk/.

b/ arány = 1, nincs receptor szelektivitás;

arány > 1, TNFR-p55 szelektivitás;

arány < 1, TNFR-p75 szelektivitás.

A találmányunk szerinti muteinek

ID_{50} TNFR-p55

ID_{50} TNFR-p75

értéke 1-nél kisebb kell hogy legyen. Ez az érték általában 0,5-nél kisebb, azonban előnyösen 0,2-nél kisebb vagy ezzel egyenlő /lásd: az 5. igénypont szerinti muteinek/ és még előnyösebben 0,1-nél kisebb vagy ezzel egyenlő /lásd: 6. igénypont szerinti muteinek/. Az 1. táblázatban feltüntetett "<" vagy "<<" jelölések esetében a szóbanforgó muteinek előnyösen a fenti tartományokba tartoznak.

- c/ E muteinek esetében legalább három különböző lizátumot készítettünk el és vizsgáltunk; az átlagos ID₅₀ értékeket tüntetjük fel.
- d/ Ezek a muteinek az E. coli lizátumok készítésénél alkalmazott körülmények között csak részlegesen oldhatók /megjegyezzük azonban, hogy különböző tisztítási módszerek esetén eltérő oldhatósági viszonyok alakulhatnak ki/. Az oldható mutein koncentrációját ezekben a lizátumokban SDS-PAGE analízissel határozzuk meg és a kapott érték 0,05 mg/ml-nél kisebb.
- e/ A L29S és R32W muteineket dr. W. Fiers laboratóriumában /Ghenti egyetem/ készítették el /lásd: továbbá EP 486 908 sz. európai szabadalmi leírás/.

3. táblázat

Szelektált humán TNF- α muteinek kötődése humán TNFR-p75 és TNFR-p55 receptorokhoz

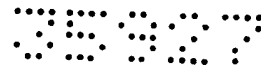
Mutein	¹²⁵ I-TNF- α kötődés 50 %-os gátlásához szükséges mutein koncentráció		A kötődési affinitás vadtypusú termékhez ^{b/} viszonyított csökkenése	
	IC ₅₀ ^{a/} TNFR-p55	TNFR-p75	TNFR-p55	TNFR-p75
	ng/ml	ng/ml	-szoros	-szoros
D143N	>100'000	300	>2'500	6.7
D143Y	>100'000	350	>6'660	17.5
A145F	500	30	33	1.5
A145R	100'000	35	2'500	0.8
A145W	10'000	100	250	2.5
D143N- A145R	>>100'000	300	>>2'500	6.7

A humán TNFR-p75 receptorhoz preferenciálisan kötődő muteineket szelektáljuk /lásd: 2. táblázat/ és szekvenciális ioncserélő kromatográfiával látszólagos homogenitásig tisztítjuk. A tisztított muteinek szelektív receptor kötődési aktivitását szilárdfázisú radioligand kötődési vizsgálattal mérjük. A humán vad-típusú $^{125}\text{I-TNF-}\alpha$ /10 ng/ml/ rögzített humán TNFR-p75 és TNFR-p55 receptorhoz történő kompetitív kötődési gátlásának meghatározásához különböző mutein koncentrációkat vizsgálunk / 10^2 - 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$; tízszeres sorozathigitás/. Az IC_{50} értékeket /50 %-os gátláshoz szükséges koncentráció/ oly módon határozzuk meg, hogy a kötődés gátlását a koncentrációval szemben ábrázoljuk.

a/ ">" jelölés mérhető kompetitív kötődést jelent, amelynek értéke azonban 100 $\mu\text{g/ml}$ mellett 50 %-nál kisebb;

">>" jelölés azt jelzi, hogy a legmagasabb vizsgált koncentrációban /100 $\mu\text{g/ml}$ / mérhető kompetitív gátlást nem tapasztalunk.

b/ Az affinitás csökkenését oly módon számítjuk ki, hogy a muteinekre kapott IC_{50} értékeket a vad-típusú TNF- α -ra kapott IC_{50} értékekkel elosztjuk. A vad-típusú TNF- α IC_{50} értékét minden kísérlet-sorozatnál meghatározzuk; a kapott értékek 15-45 mg/ml tartományba esnek, a felhasznált radioaktív jóddal jelzett TNF- α -tól függően.



Szabadalmi igénypontok:

1/ Humán p75-TNF- α -receptorhoz a humán p55-TNF- α -receptornál nagyobb kötődési affinitást mutató humán TNF- α muteinek vagy gyógyászatilag alkalmas sóik.

2/ Az 1. igénypont szerinti vegyület, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a vadttípusú humán TNF- α -hoz viszonyítva, a vadttípusú humán TNF- α -nak megfelelő 33, 65, 67, 75, 143, 145 és/vagy 147 helyzetben legalább egy aminosav-változtatást tartalmaz.

3/ A 2. igénypont szerinti vegyület, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a mutein a vadttípusú humán TNF- α -nak megfelelő 143 és/vagy 145 helyzetben legalább egy aminosav-változtatást tartalmaz.

4/ A 2. igénypont szerinti vegyület, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a mutein a vadttípusú szekvenciának megfelelő helyzetekben legalább egy alábbi aminosav-változtatást tartalmaz:

A33T
K65A
K65W
Q67K
Q67T
Q67Y
L75H
L75W
D143N
D143E
D143F
D143W
D143Y
D143V
D143V - F144L - A145S
D143N - A145R

D143V - A145S

A145R

A145D

A145G

A145H

A145K

A145F

A145S

A145T

A145W

A145Y

A145V

E146R

S147L

5/ A 4. igénypont szerinti vegyület, a z z a l
j e l l e m e z v e, hogy a mutein a vadtipusú szekvenciának
megfelelő helyzetekben legalább egy aminosav-változtatást tar-
talmaz:

K65W

D143N

D143E

D143F

D143W

D143Y

D143V

D143V - F144L - A145S

D143N - A145R

D143V - A145S

A145R

A145H

A145K

A145F

A145W

A145Y

6/ Az 5. igénypont szerinti vegyület, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a mutein a vadtipusú szekvenciának megfelelő helyzetekben legalább egy alábbi aminosav-változtatást tartalmaz:

D143N

D143E

D143F

D143W

D143Y

D143V

D143V - F144L - A145S

D143N - A145R

D143V - A145S

A145R

A145K

A145F

A145W

A145Y

7/ Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti vegyület a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a mutein a vadtipusú szekvenciának megfelelő helyzetekben legalább egy aminosav-változtatást tartalmaz:

D143N

D143Y

A145F

A145R

A145W

D143N - A145R

8/ Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti vegyület pegilezett formában.

9/ Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti muteint kódoló DNS-szekvencia.

10/ A 9. igénypont szerinti DNS szekvenciát tartalmazó vektor.

11/ A 10. igénypont szerinti vektort tartalmazó gazdasajt.

12/ A 10. igénypont szerinti DNS-szekvenciával komplementer RNS-szekvencia.

13/ Gyógyászati készítmény a z z a l j e l l e m e z v e, hogy hatóanyagként valamely, az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet és inert gyógyászatilag alkalmas hordozóanyagot tartalmaz.

14/ Eljárás humán p75-TNF-receptorhoz a humán p55-TNF-receptorhoz viszonyítva nagyobb kötődési affinitást mutató humán TNF- α muteinek, adott esetben pegilezett formában, vagy gyógyászatilag alkalmas sóik előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy valamely, a fenti muteineket kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó kifejező vektorral transzformált gazdasajtet megfelelő táptalajban tenyésztünk, majd a muteint tisztítjuk és az ily módon kapott tisztított muteint adott esetben az irodalomból ismert módszerekkel pegilezzük vagy sóvá alakítjuk.

15/ A 14. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy olyan muteint állítunk elő, amely a vadtipusú humán TNF- α -hoz viszonyítva, a vadtipusú humán TNF- α -nak megfelelő 33, 65, 67, 75, 143, 145 és/vagy 147 helyzetben legalább egy aminosav-változtatást tartalmaz.

16/ A 15. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m z v e, hogy olyan muteint állítunk elő, amely a vadtipusú humán TNF- α -hoz viszonyítva, a vadtipusú humán TNF- α -nak megfelelő 143 és/vagy 145 helyzetben legalább egy aminosav-változtatást tartalmaz.

17/ A 15. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy olyan muteint állítunk elő, amely a vadtipusú szekvenciához viszonyítva az alábbi helyzetekben legalább egy alábbi aminosav-változtatást tartalmaz:

A33T

K65A

K65W

Q67K

Q67T

Q67Y

L75H

L75W

D143N

D143E

D143F

D143W

D143Y

D143V

D143V - F144L - A145S

D143N - A145R

D143V - A145S

A145R

A145D

A145G

A145H

A145K

A145F

A145S

A145T

A145W

A145Y

A145V

E146R

S147L

18/ A 17. igénypont szerinti eljárás, a z z a l
j e l l e m e z v e, hogy olyan muteint állítunk elő, amely a
vadtipusú szekvenciának megfelelő helyzetekben legalább egy
alábbi aminosav-változtatást tartalmaz:

K65W

D143N

D143E

D143F

D143W

D143Y

D143V

D143V - F144L - A145S

D143N - A145R

D143V - A145S

A145R

A145H

A145K

A145F

A145W

A145Y

19/ A 18. igénypont szerint eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy olyan muteint állítunk elő, amely a vadttípusú szekvenciának megfelelő helyzetekben legalább egy alábbi aminosav-változtatást tartalmaz:

D143N

D143E

D143F

D143W

D143Y

D143V

D143V - F144L - A145S

D143N - A145R

D143V - A145S

A145R

A145K

A145F

A145W

A145Y

20/ A 14-19. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy olyan muteint állítunk elő, amely a vadttípusú szekvenciának megfelelő helyzetekben legalább egy alábbi aminosav-változtatást tartalmaz:

D143N

D143Y

A145F

A145R

A145W

D143N - A145R

21/ A 14-20. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy gazdasejtként valamely prokarióta vagy alacsonyabbrendű eukarióta gazdasejtet alkalmazunk.

22/ A 21. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy prokarióta gazdasejtként valamely E.coli sejtet alkalmazunk.

23/ A 14-22. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy kifejező vektorként valamely, a pDS családba tartozó vektort alkalmazunk.

24/ Eljárás gyógyászati készítmények előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy valamely, a 14-23. igénypontok bármelyike szerint előállított vegyületet, és kívánt esetben további gyógyászati hatóanyagot vagy hatóanyagokat, nemtoxikus inert gyógyászatiilag alkalmas hordozóanyagokkal összekeverünk és a keveréket galenikus formára hozzuk.

25/ A 14-23. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított vegyületek felhasználása a 13. igénypont szerinti gyógyászati készítmények előállítására.

26/ DNS-szekvencia a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a 14-23. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított vegyületet kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz.

27/ Vektor, különösen valamely prokarióta vagy alacsonyabbrendű eukarióta gazdasejtben történő kifejezésre a z z a l

j e l l e m e z v e, hogy valamely, a 26. igénypont szerinti DNS-szekvenciát tartalmaz.

28/ Gazdasejt, különösen valamely prokarióta vagy alacsonyabbrendű eukarióta gazdasejt, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy valamely, a 27. igénypont szerinti vektorral transzformálva van.

29/ A 28. igénypont szerinti gazdasejt, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy valamely E. coli sejt.

A bejelentő helyett

a meghatalmazott:

Tóth-Urbán László

Dr. Tóth-Urbán László

ügyvéd

1093 Budapest, Közraktár u. 24. I. 11/a

Adószám: 41462056-2-21

OTP számlaszám: 218-98055

14541-5

58 oldal

+ 11 ábracsoport

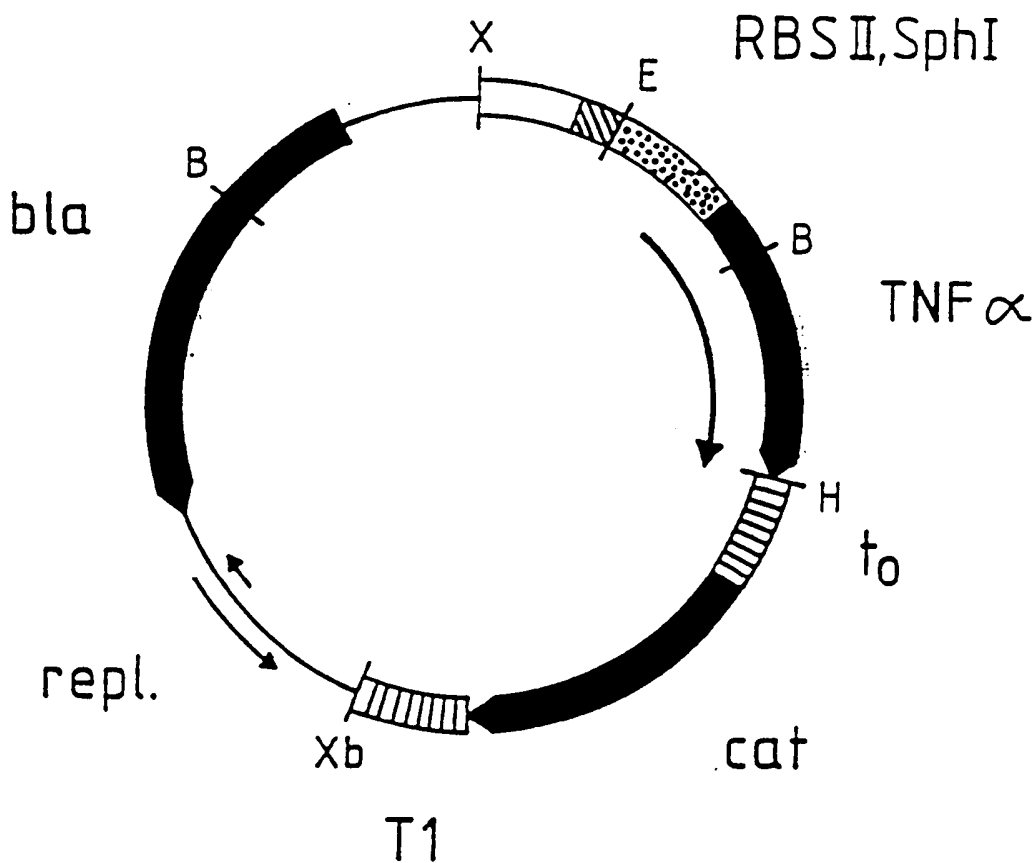
69 oldal

Tóth-Urbán László

68218

1A ábra

N250PSN250P29



Tóth-Urbán László

Dr. Tóth-Urbán László
ügyvéd
1093 Budapest, Közraktár u. 24. I. 11/a
Adószám: 41462056-2-21
OTP számlaszám: 218-98055
14541-5



1B/1 ábra

XhoI
 1 CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT

EcoRI
 51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAG
 101 AGGAGAAATT AAGCATGGTC AGATCATCTT CTCGAACCCC GAGTGACAAG
 Val ArgSerSerS erArgThrPr oSerAspLys
 1 11
 151 CCTGTAGCCC ATGTTGTGCG GAACCCTCAA GCTGAGGGGC AGCTCCAGTG
 ProValAlaH isValValAl aAsnProGln AlaGluGlyG lnLeuGlnTr
 21

BglI
 201 GCTGAACCGC CGGGCCAATG CCCTCCTGGC CAATGGCGTG GAGCTGAGAG
 pLeuAsnArg ArgAlaAsnA laLeuLeuAl aAsnGlyVal GluLeuArgA
 31 41
 251 ATAACCAGCT GGTGGTGCCA TCAGAGGGCC TGTACCTCAT CTACTCCCAG
 spAsnGlnLe uValValPro SerGluGlyL euTyrLeuIl eTyrSerGln
 51 61
 301 GTCCTCTTCA AGGGCCAAGG CTGCCCCCTCC ACCCATGTGC TCCTCACCCA
 ValLeuPheL ysGlyGlnGl yCysProSer ThrHisValL euLeuThrHi
 71
 351 CACCATCAGC CGCATGCGCG TCTCCTACCA GACCAAGGTC AACCTCCTCT
 sThrIleSer ArgIleAlaV alSerTyrGl nThrLysVal AsnLeuLeuS
 81 91
 401 CTGCCATCAA GAGCCCCTGC CAGAGGGAGA CCCCAGAGGG GGCTGAGGCC
 erAlaIleLy sSerProCys GlnArgGluT hrProGluGl yAlaGluAla
 101 111
 451 AAGCCCTGGT ATGAGCCCAT CTATCTGGGA GGGGTCTTCC AGCTGGAGAA
 LysProTrpT yrGluProIl eTyrLeuGly GlyValPheG lnLeuGluLy
 121
 501 GGGTGACCGA CTCAGCGCTG AGATCAATCG GCCCGACTAT CTCGACTTTG
 sGlyAspArg LeuSerAlaG luIleAsnAr gProAspTyr LeuAspPheA
 131 141
 551 CCGAGTCTGG GCAGGTCCTAC TTGCGGATCA TTGCCCTGTG AGGAGGACGA
 laGluSerGl yGlnValTyr PheGlyIleI leAlaLeu
 151 157
 601 ACATCCAACC TTCCCAAAGC CCTCCCCTGC CCCAATCCCT TTATACCCC
 651 CTCCTTCAGA CACCCCAAC CTCTTCTGGC TCAAAAAGAG AATTTGGGGC

HindIII
 701 TTAGGGTGGG AACCCAAGCT TGGACTCCTG TTGATAGATC CAGTAATGAC
 751 CTCAGAACTC CATCTGGATT TGTTCAGAAC GCTCGGTTGC CGCCGGGCGT



1B/2 ábra

801 TTTTATTGG TGAGAATCCA AGCTAGCTTG GCGAGATTTT CAGGAGCTAA
851 GGAAGCTAAA ATGGAGAAA AAATCACTGG ATATACCACC GTTGATATAT
901 CCCAATGGCA TCGTAAAGAA CATTTTGAGG CATTTTCAGTC AGTTGCTCAA
951 TGTACCTATA ACCAGACCGT TCAGCTGGAT ATTACGGCCT TTTTAAAGAC
1001 CGTAAAGAAA AATAAGCACA AGTTTTATCC GGCTTTTATT CACATTCGTG
1051 CCGCCTGAT GAATGCTCAT CCGGAATTC GTATGGCAAT GAAAGACGGT
1101 GAGCTGGTGA TATGGGATAG TGTTACCCTT TGTTACACCG TTTTCCATGA
1151 GCAAACGTAA ACGTTTTAT CATCTCTGGAG TGAATACCAC GACGATTTCC
1201 GGCAGTTTCT ACACATATAT TCGCAAGATG TGGCGTGTTA CCGTGAAAC
1251 CTGGCCTATT TCCCTAAAGG GTTTATTGAG AATATGTTTT TCGTCTCAGC
1301 CAATCCCTGG GTGAGTTTCA CCAGTTTGA TTTAAACGTG GCCAATATGG
1351 ACAACTTCTT CGCCCCCGTT TTCACCATGG GCAAATATTA TACGCAAGGC
1401 GACAAGGTGC TGAATGCGCT GCGAATTCAG GTTCATCATG CCGTCTGTGA
1451 TGGCTTCCAT GTGGGCAGAA TGCTTAAATGA ATTACAACAG TACTGCGATG
1501 AGTGGCAGGG CGGGGCGTAA TTTTTTAAAG GCAGTTATTG GTGCCCTTAA
1551 ACGCCTGGGG TAATGACTCT CTAGCTTGAG GCATCAAATA AAACGAAAGG
1601 CTCAGTCGAA AGACTGGGCC TTTGTTTTTA TCTGTTGTTT GTCGGTGAAC

XbaI

1651 GCTCTCCTGA GTAGGACAAA TCCGCGCTC TAGAGCTGCC TCGCGGTTT
1701 CCGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA
1751 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG
1801 TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
1851 CGATAGCGGA GTGTAACTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT
1901 ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TCGTAAAGGA
1951 GAAAATACCG CATCAGGCGC TCITCCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTGCTG
2001 CGCTCGGTCT GTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT
2051 AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG
2101 CAAAAGGCCA GAAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCG GTTCTGCGG



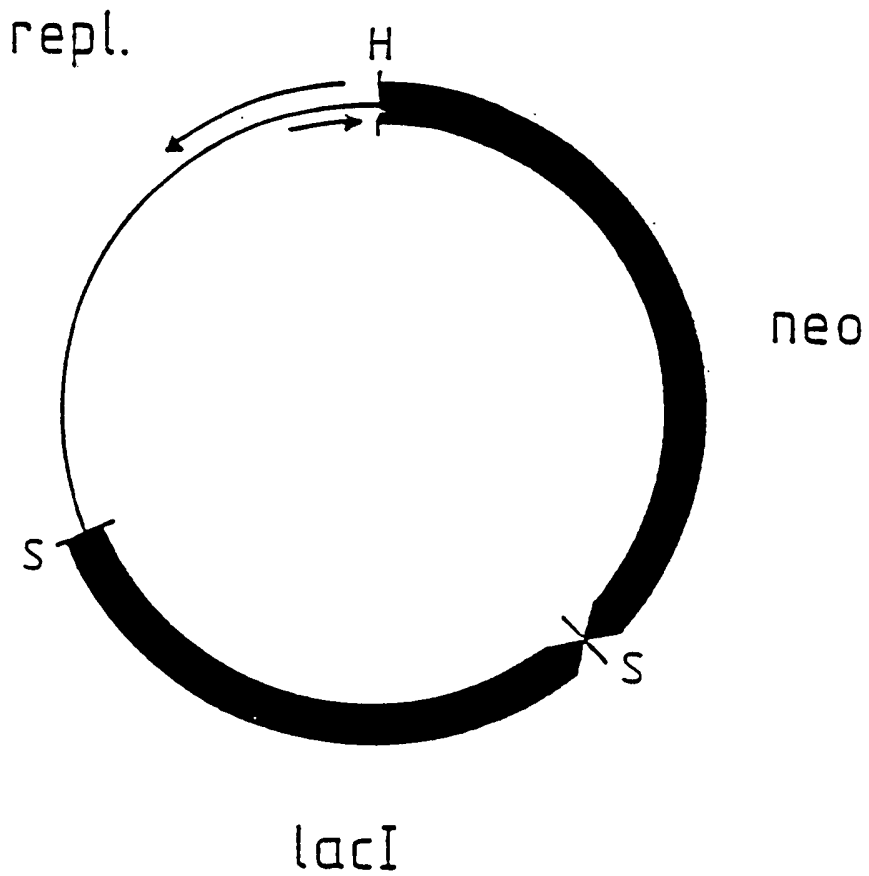
1B/3 ábra

2151 TTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAA ATCGACGCTC
2201 AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCCTTTC
2251 CCCCTGGAAG CTCCTCTGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC
2301 GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCAATG
2351 CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTG GGTCTGTTGC TCCAAGCTGG
2401 GCTGTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT
2451 AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC
2501 AGCAGCCACT GGTAAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA
2551 CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA
2601 TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG
2651 TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG
2701 TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT
2751 TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA
2801 AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT
2851 TAAATTA AAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAACT
2901 TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT
2951 CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGCTGCCTG ACTCCCGTTC GTGTAGATAA
3001 CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG
3051 CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC
BglI
3101 CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCTGTC AACTTTTATCC GCCTCCATCC
3151 AGTCTATTA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT
3201 AGTTTGGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC
3251 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG
3301 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCCGGTCTT
3351 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT
3401 GGCAGCACTG CATAATCTC TTA CTGTGCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT
3451 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG

1B/4 ábra

3501 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA
 3551 TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTTG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA
 3601 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTGAT GTAACCCACT
 3651 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG
 3701 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGA ATAAGGGCGA
 3751 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTTCATA TTATTGAAGC
 3801 ATTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA
 3851 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCGA AAAGTGCCAC
 3901 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG
 3951 CGTATCACGA GGCCCTTTTCG TCTTCAC

2A ábra





2B/1 ábra

HindIII
1 AAGCTTCACG CTGCCGCAAG CACTCAGGGC GCAAGGGCTG CTAAGGAAG
51 CGGAACACGT AGAAAGCCAG TCCGCAGAAA CGGTGCTGAC CCCGGATGAA
101 TGTCAGCTAC TGGGCTATCT GGACAAGGGA AAACGCAAGC GCAAAGAGAA
151 AGCAGGTAGC TTGCAGTGGG CTACATGGC GATAGCTAGA CTGGGGGGTT
201 TTATGGACAG CAAGCGAACC GGAATGCCA GCTGGGGGCG CCCTGGTAA
251 GGTGGGAAG CCTGCAAAG TAACTGGAT GGCTTCTTG CGCCAAGGA
301 TCTGATGGCG CAGGGATCA AGATCTGATC AAGAGACAGG ATGACGGTCC
351 TTTCCATGC TTGAACAAGA TGGATGCAC GCAGGTCTC CGGCCGCTG
401 GGTGGAGAGG CTATTCGGCT ATGACTGGC ACAACAGACA ATCGGCTGCT
451 CTGATGCCGC CGTGTCCGG CTGTCAGGC AGGGGGGCC GGTCTTTTT
501 GTCAAGACCG ACCGTCCGG TGCCCTGAAT GAAGTGCAGG ACCAGGCAGC
551 GCGGCTATCG TGGCTGGCCA CGACGGGGT TCCTTGGCA GCTGTGCTCG
601 ACGTTGTAC TGAAGCGGA AGGGACTGGC TGCTATTGGG CGAAGTCCG
651 GGGCAGGATC TCCGTGATC TCACCTTGCT CCTGCGAGA AAGTATCCAT
701 CATGGCTGAT GCAATGCGC GGCTGCATC GCTTGATCCG GCTACCTGCC
751 CATTCGACCA CCAAGCGAAA CATCGCATCG AGCGAGCAGG TACTGGGATG
801 GAAGCCGGTC TTGTGATCA GGATGATCTG GACGAAGAGC ATCAGGGGCT
851 CGGCCAGCC GAACGTTCG CCAGGCTCAA GGGGGCATG CCGAGCGCG
901 AGGATCTCGT CGTGACCCAT GCGATGCCT GCTTGGCGAA TATCATGGTG
951 GAAAATGGCC GCTTCTTGG ATTCATCGAC TGTGGCGGC TGGGTGTGGC
1001 GGACCGCTAT CAGGACATAG CGTGGCTAC CCGTGATATT GCTGAAGAGC
1051 TTGGCGGCGA ATGGGCTGAC CGCTTCTCG TGGTTCAGG TATCGCGCT
1101 CCCGATTCGC AGCGCATCGC CTCTATCGC CTCTGTGACG AGTCTCTG
1151 AGCGGGACTC TGGGGTTCGA AATGACCGAC CAAGCGAGC CCAACCTGCC
1201 ATCAGGAGAT TTGATTCGA CCGCCGCTT CTATGAAAGG TTGGGCTTCG
1251 GAATCGTTTT CCGGACGCC GGCTGGATGA TCCTCCAGCG CCGGGATCTC
1301 ATGCTGGAGT TCTTCGCCA CCGGGGCTC GATCCCTCG CGAGTGGTT



2B/2 ábra

1351 CAGCTGCTGC CTGAGGCTGG ACGACCTCGC GGAGTTCTAC CGGCAGTGCA
1401 AATCCGTCGG CATCCAGGAA ACCAGCAGCG GCTATCCGCG CATCCATGCC
1451 CCCGAACTGC AGGAGTGGGG AGGCACGATG GCCGCTTTGG TCGACAATTC
1501 GCGCTAACTT ACAATTAATG CGTTGCGCTC ACTGCCCGCT TTCCAGTCCG
1551 GAAACCTGTC GTGCCAGCTG CATTAATGAA TCGGCCAACG CGCGGGGAGA
1601 GGCGTTTTCG GTATGGGGCG CCAGGGTGGT TTTTCTTTTC ACCAGTGAGA
1651 CGGGCAACAG CTGATTGCCC TTCACCGCCT GGCCCTGAGA GAGTTGCAGC
1701 AAGCGGTCCA CGCTGGTTTG CCCAGCAGG CGAAAATCCT GTTTGATGGT
1751 GGTTAACGGC GGGATATAAC ATGAGCTGTC TTCGGTATCG TCGTATCCCA
1801 CTACCGAGAT ATCCGCACCA ACGCGCAGCC CGGACTCGGT AATGGCGGGC
1851 ATTGCGCCCA GCGCCATCTG ATCGTTGGCA ACCAGCATCG CAGTGGGAAC
1901 GATGCCCTCA TTCAGCATTT GCATGGTTTG TTGAAAACCG GACATGGCAC
1951 TCCAGTCCGC TTCCCGTTCC GCTATCGGCT GAATTTGATT GCGAGTGAGA
2001 TATTTAATGCC AGCCAGCCAG ACGCAGACGC GCCGAGACAG AACTTAATGG
2051 GCCCGCTAAC AGCGCGATTT GCTGGTGACC CAATGCGACC AGATGCTCCA
2101 CGCCCAGTCG CGTACCGTCT TCATGGGAGA AAATAATACT GTTGATGGGT
2151 GTCTGGTCAG AGACATCAAG AAATAACGCC GGAACATTAG TGCAGGCAGC
2201 TTCCACAGCA ATGGCATCCT GGTCAATCCAG CGGATAGTTA ATGATCAGCC
2251 CACTGACGGG TTGCGCGAGA AGATTGTGCA CCGCCGCTTT ACAGGCTTCG
2301 ACGCCGCTTC GTTCTACCAT CGACACCACC ACGCTGGCAC CCAGTTGATC
2351 GGCGCGAGAT TTAATCGCCG CGACAATTTG CGACGGCGCG TGCAGGGCCA
2401 GACTGGAGGT GGCAACGCCA ATCAGCAACG ACTGTTTGCC CGCCAGTTGT
2451 TGTGCCACGC GGTGGGAAT GTAATTCAGC TCCGCCATCG CCGCTTCCAC
2501 TTTTTCCTCG GTTTTCGAG AAACGTGGCT GGCTGGTTC ACCACGCGGG
2551 AAACGGTCTG ATAAGAGACA CCGGCATACT CTGCGACATC GTATAACGTT
2601 ACTGGTTTCA CATTACCAC CCTGAATTGA CTCTCTTCCG GGCGCTATCA
2651 TGCCATACCG CGAAAGGTTT TCGCCATTC GATGGTGTCA ACGTAAATGC

SalI

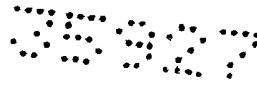
Dr. Tóth-Urbán László

ügyvéd

1093 Budapest, Közraktár u. 24. I. 11/a

Adószám: 41462056-2-21

OTP számlaszám: 218-98055



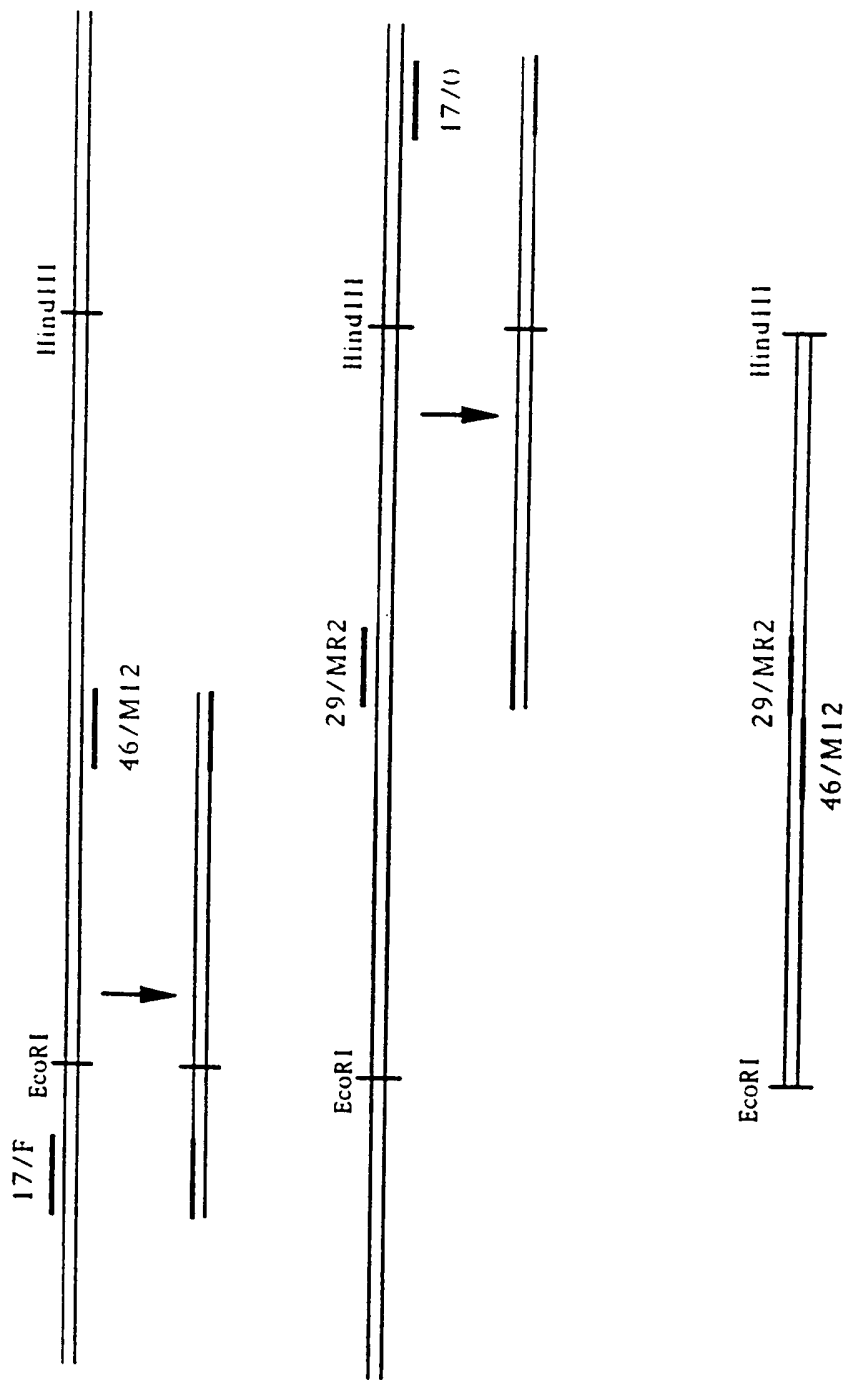
2B/3 ábra

sali

2701 ATGCCGCTTC GCCTTCGGCG GCGAATTGTC GACCCGTGCC CTCCTGTCA
2751 GCTACTGACG GGGTGGTGGC TAACGGCAAA AGCACCGCCG GACATCAGCG
2801 CTAGCGGAGT GTATACTGGC TTAATAATGTT GGCACTGATG AGGGTGTGAG
2851 TGAAGTGCTT CATGTGGCAG GAGAAAAAAG GCTGCACCGG TGGTTCAGCA
2901 GAATATGTGA TACAGGATAT ATTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTAC
2951 GCTCGGTGCT TCGACTGCGG CGAGCGGAAA TGGCTTACGA ACGGGGCGGA
3001 GATTCCTGG AAGATGCCAG GAAGATACTT AACAGGGAAG TGAGAGGGCC
3051 GCGGCAAAGC CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACA AGCATCACGA
3101 AATCTGACGC TCAAATCAGT GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT
3151 ACCAGGCGTT TCCCCTGGCG GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCTGCCT
3201 TTCGGTTTAC CGGTGTCATT CCGCTGTAT GCGCGGTTTT GTCTCATCC
3251 ACGCCTGACA CTCAGTTCGG GGTAGGCAGT TCGCTCCAAG CTGGACTGTA
3301 TGCACGAACC CCCCCTCAG TCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACTAT
3351 CGTCTTGAGT CCAACCCGGA AAGACATGCA AAAGCACCAC TGGCAGCAGC
3401 CACTGGTAAT TGATTTAGAG GAGTTAGTCT TGAAGTCATG CGCCGGTTAA
3451 GGCTAAACTG AAAGGACAAG TTTTGGTGAC TGGCTCTCCT CAAGCCAGTT
3501 ACCTCGGTTT AAAGAGTTGG TAGCTCAGAG AACCTTCGAA AAACCGCCCT
3551 GCAAGGCGGT TTTTTCGTTT TCAGAGCAAG AGATTACGGC CAGACCAAAA
3601 CGATCTCAAG AAGATCATCT TATTAATCAG ATAAAATAAT TCTAGATTTT
3651 AGTGCAATTT ATCTCTTCAA ATGTAGCACC TGAAGTCAGC CCCATACGAT
3701 ATAAGTTGTT AATCTCATG TTTGACAGCT TATCATCGAT

Dr. Tóth-Érdős Zsolt
Dr. Tóth-Érdős Zsolt

3 ábra



I. reakció
↓
I. fragmens

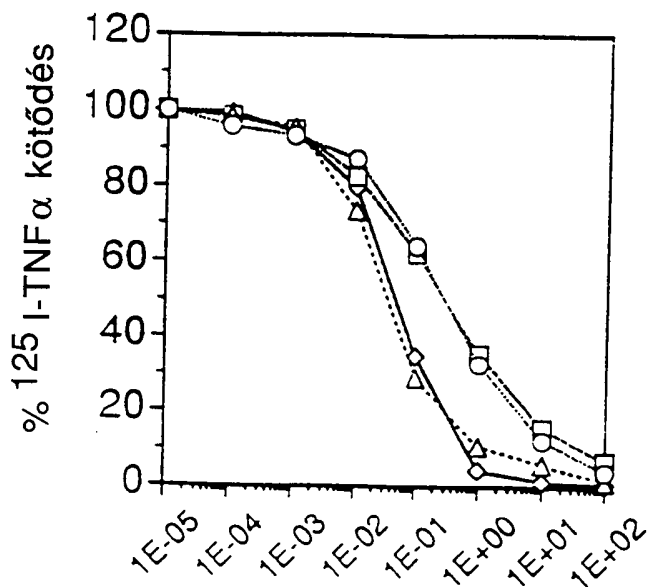
II. reakció
↓
II. fragmens

A fragmens

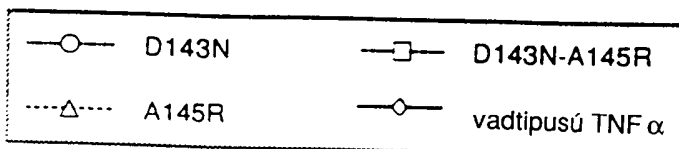
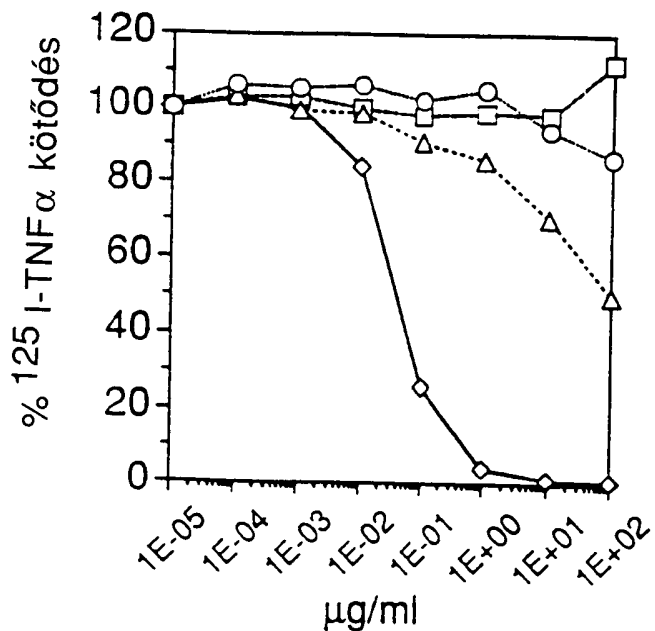
Tóth-Urbán László
Dr. Tóth-Urbán László
 ügyvéd
 1093 Budapest, Közraktár u. 24. I. 11/a
 Adószám: 41462056-2-21
 OTP számlaszám: 218-98055
 14541-5

4 ábra

TNFR-p75



TNFR-p55



Handwritten signature

Dr. Tóth-Urbán László
 ügyvéd
 1093 Budapest, Közraktár u. 24. I. 11/a
 Adószám: 41462056-2-21
 OTP számlaszám: 218-98055