



(19) Országkód

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**215 587 B**

(21) A bejelentés ügyszám: P 92 03955  
(22) A bejelentés napja: 1991. 04. 17.  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/FR 91/00318  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/18626

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

**C 12 N 15/12**

C 12 N 15/62

C 07 K 14/00

A 61 K 38/02

G 01 N 33/68

(40) A közzététel napja: 1994. 06. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1999. 01. 28.

(72) Feltalálók:

Eid, Pierre, Párizs (FR)  
Gresser, Ion, Párizs (FR)  
Lutfalla, Georges, Párizs (FR)  
Meyer, Francois, Villejuif (FR)  
Mogensen, Knud Erik, Párizs (FR)  
Tovey, Michael, Párizs (FR)  
Uze, Gilles, Párizs (FR)

(73) Szabadalmas:

Laboratoire Européen de Biotechnologie, Párizs  
(FR)

(74) Képviselő:

dr. Tóth-Urbán László és dr. Jalsovszky  
Györgyné, Budapest

**(54) Eljárás alfa- és béta-interferonokkal szemben nagy affinitással rendelkező  
vízoldható polipeptidek, az azokat kódoló DNS-szekvenciák, a polipeptideket  
kifejezni képes sejtek és a polipeptideket tartalmazó  
gyógyászati készítmények előállítására**

### **KIVONAT**

A találmány tárgya eljárás  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferonnal szemben nagy affinitással rendelkező vízoldható polipeptidek előállítására önmagukban vagy egy második polipeptiddel képezett hibridek formájában. A találmány értelmében az adott polipeptidet vagy hibridet kifejezni képes sejteket alkalmas közegen tenyésztik, majd a kifejezett terméket elkülönítik.

A fenti polipeptideket és hibrideket kódoló DNS-szekvenciák, a fenti polipeptideket és hibrideket kifejező sejtek és a fenti polipeptideket és hibrideket tartalmazó gyógyászati készítmények előállítása, továbbá interferon receptor elleni antitestek előállítása és kimutatása is a találmány tárgyát képezi.

A találmány tárgya eljárás új vízoldható polipeptidek, az azokat kódoló DNS-szekvenciák, a polipeptideket kifejezni képes sejtek, valamint a polipeptideket tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására. A találmány tárgya továbbá eljárás interferon receptor elleni antitestek előállítására, és az ilyen antitestek jelenlétének diagnosztikai kimutatására.

Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon a különböző biológiai tulajdonságokkal rendelkező kiválasztott fehérjék egyik csoportját képezi, és gerincesek sejtjeiben vírusellenes és burjánzásellenes állapotot hoz létre. [I. Gresser és M. G. Tovay: *Biochem. Biophys. Acta* 516, 23 (1978)].

Az  $\alpha$ -interferon jelentős hatást fejt ki az immunrendszerre, a sejtrendszerre és a humorális rendszerre, és elsősorban a B-sejtek poliklónos aktiválásában [M. Peters: *J. Immunol.* 137, 3153 (1986)], a T-sejtek funkcióinak gátlásában [J. Knop és társai: *J. Immunol.* 133, 2412 (1984)] és a hisztokompatibilitás-antigének kifejezésének módosításában [M. Fellous és társai: *Eur. J. Immunol.* 9, 446 (1979)] vesz részt. Mindezek a folyamatok szerepet játszanak az autoimmunitás kialakulásában.

Bár az interferont a szervezet hasznos tényezőjének tekintik, abnormális termelése oki szerepet játszhat egyes betegségek kórfolyamatában, és különböző úgynevezett autoimmun-betegséggel kapcsolatos. Magas interferonszint észlelhető például a lupus erythematosusban, reumás artritiszben, Behcet-szindrómában, cukorbetegségben, többszörös szklerózisban, csontvelő-apláziában és a súlyos immunhiányos betegségben szenvedő betegek szérumában és szöveiteiben. Közvetlen összefüggés áll fenn a túlzott interferonszint és a rossz prognózisú AIDS-betegség kifejlődése között [E. Buimovivi-Klein és társai: *AIDS Res.* 2, 99 (1986)].

Ismeretes, hogy az emberi lupus erythematosus állapotmodelljeként szolgáló spontán betegségben szenvedő speciális egértörzshöz (NZB) tartozó egereknek  $\alpha$ - vagy  $\beta$ -interferont beadva súlyosbodik a betegség előrehaladása [H. Heremans és társai: *Infect. Immun.* 21, 925 (1978), C. Adam és társai: *Clin. Exp. Immunol.* 40, 373 (1980)].

Fiatal egerekben nagy mennyiségű interferon beadása növekedésgátló szindrómát, májnekrozist és pusztulást idéz elő [I. Gresser és társai: *Nature* 258, 76 (1973)]. Hasonlóképpen, ha nőstény egereket neonatális életszakaszukban bizonyos vírusokkal (pl. Pichinda limfocita choriomeningitis vírussal vagy reovírussal) fertőznek meg, nagy mennyiségű endogén interferon termelődik, ami ugyanazt a halálos szindrómát okozza. Az ilyen vírusokkal születéskor megfertőzött fiatal egerek azonban  $\alpha$ - vagy  $\beta$ -interferon beadásával megvédhetők a fenti szindrómától [Y. Riviere és társai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 2135 (1977), Y. Riviere és társai: *J. Exp. Med.* 152, 633 (1980), T. Clark és társai: *J. Virol.* 59, 728 (1986)]. Ez a kísérlet meggyőzően bizonyítja az interferonnak a fenti betegség kórfolyamatában kifejtett káros szerepét.

Ismert az is, hogy mind az NK-sejtek aktiválását, mind a hisztokompatibilitás-antigének kifejezésének módosulását – amelyek döntő szerepet játszanak az átül-

tett csontvelő kilökődésében – az  $\alpha$ - vagy a  $\beta$ -interferon szabályozza [C. Chien és társai: *Science* 246, 66 (1989)]. Afifi és társai [J. Immunol. 134, 3739 (1985)] kimutatták, hogy ha F1 egereket vagy allogén egereket rágszáló eredetű anti- $\alpha$ - vagy  $\beta$ -interferon-szérummal kezelnek, lehetővé válik a parentális vagy allogén csontvelő átültetése és elszaporodása. Ez a tény azt igazolja, hogy az  $\alpha$ - vagy  $\beta$ -interferon-termelés F1 hibrid egereken a csontvelő-átültetéssel szembeni ellenállás kialakulásának egyik kulcsfontosságú eleme.

Ismeretes, hogy az interferonok és altípusaik biológiai hatásai azáltal lépnek fel, hogy az interferonok egy specifikus, a sejtfelülethez nagy affinitást mutató receptorral lépnek kölcsönhatásba [M. Aquet és K. E. Mogensen: *Academic Press, London*, (1983)].

Jelenleg az autoimmun-betegségek és az azokkal kapcsolatos más betegségek (pl. sclerosis multiplex) kezelésére nem áll rendelkezésre megfelelő terápia. Az autoimmun-betegségek ismert kezelési eljárásai nem kielégítőek, és toxikus hatásokkal járnak. A „kilökődésellenes” terápiában használt kezelések gátolják ugyan a betegség tüneteit, az okokat azonban nem szüntetik meg, és ugyanakkor nagyon toxikusak. Nagy szükség van tehát olyan gyógyszerekre, amelyek az autoimmun-betegségek kezelésében és a szervkilökődések megakadályozásában kellően hatásosak, ugyanakkor azonban csak kevésbé toxikusak.

Nagyon célszerű lenne az  $\alpha$ - vagy  $\beta$ -interferon hatását antagonistá anyagnak injekálásával blokkolni, mert ez mind az autoimmun típusú betegségek kezelésében, mind az átültetett szövetek kilökődésének megakadályozásában gyógyászatiilag kedvező lenne. Az idegen immunglobulinok injekálásán alapuló, már hatékonynak bizonyult megoldások azonban a humán gyógyászat gyakorlatában nem jöhetnek számításba.

A *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 25–39 (1983) közlemény olyan monoklónos antitestet ismertet, amely egy humán  $\alpha$ -interferon fajtát a terminális karboxilcsoportjánál képes blokkolni. Minthogy a receptorhoz kötődésben az  $\alpha$ -interferon-molekula N-terminális része vesz részt, ez az antitest a sejtfelületi receptorhoz kötött állapotban is képes felismerni az  $\alpha$ -interferon terminális karboxilcsoportját. Ez az antitest azonban nem ismeri fel magát a humán  $\alpha$ -interferon receptort, és ez az antitest sem az  $\alpha$ -interferon receptor oldható formáival, sem a receptor ellen ható monoklónos antitestekkel nem rokon. Az idézett közleményben leírt antitest alkalmas azonban az  $\alpha$ -interferon receptor oldható formáinak kimutatására, mert képes az oldható receptorhoz kötött interferonhoz kapcsolódni. Az így kialakult oldható interferon receptor /interferon/anti-interferon monoklónos antitest komplex az anti-interferon monoklónos antitest Fc-fragmenséhez kapcsolódni képes A-fehérje/Sepharose-gyöngyökkel kicsapható, és a csapadékból kimutatható az oldható interferon receptor.

Találmányunk azon az új megközelítésen alapul, hogy az  $\alpha$ - vagy  $\beta$ -interferon hatásának blokkolására antagonistaként az  $\alpha$ -interferon specifikus receptorának oldható formáit használjuk. A természetes receptor génsebészeti eljárásokkal előállított ilyen oldható formái

megtartják a keringő vagy helyi endogén  $\alpha$ -interferont megkötő képességüket, ugyanakkor azonban nem tartalmazzák azt a molekularészt, ami a természetes receptort a sejtfelülethez rögzíti. Ezért az  $\alpha$ -interferon specifikus receptorának oldható formái szabadon keringhetnek a szervezetben, és specifikitásuk révén csak az  $\alpha$ - vagy  $\beta$ -interferonhoz kötődnek.

Az  $\alpha$ -interferon specifikus receptorának oldható formái – az antitestekhez hasonlóan – képesek az  $\alpha$ - vagy  $\beta$ -interferonnak a szervezetben kifejtett hatásait blokkolni.

A találmány értelmében az  $\alpha$ -interferon specifikus receptorának ilyen oldható formáit állítjuk elő, amelyeket a továbbiakban vízzoldható polipeptideknek nevezünk.

A találmány tárgya tehát eljárás vízzoldható polipeptidek, és

- a) az 1. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciájú polipeptid és annak delécióval és/vagy helyettesítéssel kialakított származékai,
- b) az 1. ábrán bemutatott nukleinsav-szekvencia által kódolt polipeptidek, és
- c) a 2. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciájú polipeptid delécióval és/vagy helyettesítéssel kialakított származékai előállítására önmagukban vagy egy másik polipeptiddel képezett hibridek formájában.

A találmány értelmében úgy járunk el, hogy az adott polipeptidet vagy hibridet kifejezni képes sejteket alkalmas közegen tenyésztjük, majd a kifejezett terméket elkülönítjük.

A találmány szerinti eljárással előállítható vízzoldható polipeptidek  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferonnal szemben nagy affinitást mutatnak, ami azt jelenti, hogy a komplex disszociációs állandója  $10^{-9}$  M-nél kisebb.

A „vízzoldható” kifejezés azt jelenti, hogy a polipeptid képes a szervezetben (például az emberi testben) keringeni, majd egy sejthez kötődni.

A leírásban a „hibrid” megjelölésen egy, a fentiekben meghatározott vízzoldható polipeptid (természetes receptor „oldható” része, módosított teljes receptor vagy például helyettesítéssel módosított természetes receptor „oldható” része) és egy másik polipeptid (például egy immunoglobulin vagy immunoglobulin-fragmens) fúziós vagy konjugációs termékét értjük.

Egyszerűsítés céljából a továbbiakban az „ $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptor” kifejezés helyett az „interferon receptor” kifejezést is használjuk.

A találmány szerint előállítható vízzoldható polipeptidek egyik előnyös képviselője az 1. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciájú vegyület, ami az  $\alpha$ - vagy  $\beta$ -interferon természetes natív receptorának extracelluláris oldható része.

Az ebből a polipeptidből delécióval és/vagy helyettesítéssel kialakított származékok is megtartják a fenti interferonokkal szembeni nagy affinitást. Az 1. ábrán feltüntetett polipeptid deléciókkal és/vagy helyettesítésekkel kialakított származékainak előállítása is a találmány tárgyát képezi.

A deléciókkal kapcsolatban megjegyezzük, hogy az 1. ábrán feltüntetett polipeptidben lévő egy vagy több

aminosav az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferonnal szemben mutatott affinitás kedvezőtlen változása nélkül deletálható.

A deléciók a teljes és natív receptorra is vonatkozhatnak, különösen az oldható rész szintjén. Ily módon például a sejtmembránhoz való kötődés képessége elveszthető, és ezáltal a deletált termék a keringés számára rendelkezésre áll.

Ha a natív és teljes interferon receptornak a 2. ábrán feltüntetett szekvenciájából indulunk ki, a szekvencia transzmembrán és citoplazmikus szakaszai elhagyhatók.

A transzmembrán tartománynak megfelelő 437–457. maradék és a citoplazmikus tartománynak megfelelő 458–557. maradék deletálása például oldható (keringésre képes) formák képződéséhez vezet.

A teljes  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptort kódoló aminosavak és nukleotidok teljes szekvenciáját a 2. ábrán mutatjuk be.

Amennyiben a deléciókat a transzmembrán és citoplazmikus (vagy celluláris és intracelluláris) szakaszokon végezzük el, kiküszöbölhetjük a potenciálisan immun epitópokat. A deletált transzmembrán tartomány natív  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptorok egyik előnye, hogy a rekombináns gazdasejtek szövettenyésztésének felülészójában képesek kiválasztódni.

Miként már említettük, az 1. és 2. ábrán feltüntetett aminosav-szekvenciájú polipeptidekből delécióval származtatható vízzoldható polipeptidek is a találmány szerint előállítható vegyületek közé tartoznak.

A helyettesítéssel variánsok előállítása szintén a találmány tárgyát képezi. Ezeknél az interferon szekvenciájában lévő egy vagy több aminosav eltávolítható vagy más aminosavakkal helyettesíthető oly módon, hogy az aminosav össz-száma változatlan marad.

A helyettesítések előnyösen az interferon receptor oldható részére vonatkoznak. Ha a receptor oldható részének funkciójában vagy immunológiai azonosságában számottevő változást kívánunk előidézni, olyan nem konzervatív helyettesítéseket és aminosav-maradékokat vagy szekvenciákat választunk ki, amelyek a polipeptidben eredetileg jelenlévő csoportoktól abban különböznek, ami a polipeptid háromdimenziós szerkezetének a helyettesítés közelében való megtartása, valamint a molekula vagy az oldallánc túlnyomó része konjugációjának vagy hidrofobicitásának megmaradása szempontjából a legnagyobb jelentőséggel bír.

A receptor tulajdonságait módosító helyettesítések közül különösen jelentősek az alábbiak:

- valamely aminosav-maradéknak (pl. szeril vagy treonil) hidrofób maradékkal (pl. leucil, izoleucil, fenilalanil, alanil vagy valil) történő helyettesítése,
- ciszteinil-maradéknak bármely más maradékkal történő helyettesítése,
- elektropozitív oldalláncot tartalmazó maradéknak (pl. lizil, arginil vagy hisztidinil) elektronegatív maradékkal (pl. glutamil vagy aszpartil) történő helyettesítése,
- nagy térkitöltésű láncot tartalmazó maradéknak (pl. fenilalanil) ilyen részt nem tartalmazó maradékkal történő helyettesítése.

A helyettesítéssel variánsok szintén a teljes interferon receptor szerkezetére vonatkozhatnak, és előnyösen

a transzmembrán tartományt érintik. Az ezen a szinten végzett helyettesítések csökkentik a polipeptidnek a lipidsejtekkel vagy membránokkal szembeni affinitását, és így az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptorának oldható formáit eredményezik.

A transzmembrán szakasz például egy attól eltérő olyan aminosav-szekvenciával (így homopolinukleotid DNS-szekvenciával vagy 5–50 azonos aminosavat – például szerint, lizint, arginint, glutamint és aszparaginsavat – vagy más hidrofíli aminosavakat tartalmazó bármely szekvenciával) helyettesíthető, ami lehetővé teszi, hogy az oldható receptor a rekombináns gazdaszövetek tenyésztésekor a táptalajba választódjon ki.

Az 1. és 2. ábrán bemutatott polipeptidekből helyettesítéssel származtatható vízdoldható polipeptidek előállítására is a találmány tárgyat képezi.

A fentiekből megállapítható, hogy a találmány szerint előállított polipeptidekben helyettesítések vagy delációk, valamint az ilyen módosítások kombinációi egyaránt előfordulhatnak.

Általánosságban megállapítható, hogy a helyettesítéssel és/vagy delációval kapott variánsoknak nincs funkcionális transzmembrán szakasza, és előnyösen intracelluláris (citoplazmás) része sincs.

Megjegyezzük, hogy a találmány szerint előállított vízdoldható polipeptidekből kémiai módosításokkal más variánsok is kialakíthatók. Az ilyen módosítások célja elsősorban az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptor jellemző tulajdonságainak javítása. A kémiai módosított polipeptidek például hidrofíli polimereket tartalmazhatnak [ilyen például a szabad aminosóportot hordozó aminosav-maradékokra (így a lizinre) vagy a szulfhidrilcsoportokra ojtott poli(etilén-glikol)]. A kémiai módosításokkal növelhető a polipeptidek felezési ideje a plazmában, fokozható a polipeptidek oldhatósága és/vagy csökkenthető a polipeptidek immunogén jellege. Ezeket a módosításokat önmagukban ismert módszerekkel – például a 4 179 337 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett módon – végezhetjük el.

A találmány tárgyat képezi továbbá a fentiekben meghatározott polipeptidek hibridizált (vagy emellett konjugált) módosulatainak előállítása is.

A konjugációban (hibridizációban) részt vevő második polipeptid például egy immunokompetens polipeptid lehet. Ilyen polipeptidek például azok, amelyek a hibridizált polipeptiddel kezelt állatban immunválaszokat váltanak ki, vagy amelyek az oldható interferon receptornak meg nem felelő polipeptidrésszel szembeni bármely antitesthez kapcsolódni képesek.

A receptornak meg nem felelő epitópok általában olyan antigéneket tartalmaznak, amelyeket a szervezetben már meglévő antitestek fel tudnak ismerni. Ilyenek például a baktériumok polipeptid-fragmensei, így a  $\beta$ -galaktozidáz.

Az immunkonjugációt például *in vitro* körülmények között keresztkötések kialakításával vagy egy immunogén polipeptidet kódoló DNS-sel transzformált rekombináns sejt tenyésztésének felhasználásával végeztük el.

Előnyös megoldás szerint az immunogén ágens polipeptid-kötéssel illesztjük be vagy kapcsoljuk hozzá az oldható receptorhoz vagy az oldható receptorból le származtató fragmenshez úgy, hogy az oldható receptornak megfelelő epitópokat és legalább egy, az oldható receptortól idegen epitópot tartalmazó polipeptidláncot kapjunk. Ezeket az epitópokat a polipeptidláncnak a receptorral vagy a receptor fragmensével kompatibilis bármely más lókuszába beiktathatjuk.

Ezek a hibridek különösen előnyösen hasznosíthatók interferonreceptor-ellenes antitestek kialakítására melegvérűek szervezetében. Az így termelt antitestek például diagnosztikai szerekként használhatók az interferon receptorok biológiai mintákban való jelenlétének kimutatására, vagy a natív receptor vagy az interferon oldható receptorának tisztítására alkalmazhatók.

A konjugált polipeptidek egy másik csoportját alkotják azok az esetenként immunogén hibridek, amelyek a találmány szerint előállított polipeptid C-terminális régiójával konjugált másik vízdoldható polipeptiden kívül még egy homopolimert (például pentahisztidint) is tartalmaznak. Ezek a hibridek hordozón rögzített kelátképző szerek (például cinkionok) segítségével könnyen elkülöníthetők a hibridek mellett szennyező anyagokat is tartalmazó keverékekből. A hordozóhoz kötött kelátképző szer segítségével adszorbeált hibridek egyszerűen leoldhatók a hordozóról, majd az így tisztított hibridekből kívánt esetben például enzimhasítással felszabadítható az oldható interferon receptor.

A hibridek egy további csoportját képezik azok, amelyekkel javítható az oldható receptor kiválasztása. Ezekben a hibridekben az oldható receptor szignál polipeptidjét egy heterológ szignál polipeptid helyettesíti. Ha a gazdaszövet ezt a hibridet felismeri, akkor azt fel is használja, és a receptor kiválasztódik.

A szignál polipeptideket a felhasznált gazdaszövet jellemzőinek megfelelően választjuk meg. A szignál polipeptid például baktérium-, élesztő-, gomba-, növény-, emlős- vagy víruseredetű szekvencia lehet.

A hibridek előnyös csoportját képezik azok, amelyekben a hibridképző második polipeptid speciális szerkezete révén lelassítja a hibrid lebomlását az emberi szervezetben. Az ilyen második polipeptidek igen előnyös képviselői a receptor oldható részénél hosszabb (célszerűen több mint 20 órával hosszabb) felezési idejű plazmafehérjék, amelyek a találmány szerint előállított oldható polipeptidekkel hibridizálva meghosszabbítják az oldható polipeptidek hatásának időtartamát. Ilyen plazmafehérje például a szérumban albumin és az apolipoproteinek. A plazmafehérjék különösen előnyös képviselői az immunoglobulinok, elsősorban a G típusú, kiemelkedően előnyösen a G1 típusú immunoglobulinok.

A fenti hibridek az azokkal kezelt állati vagy emberi szervezetben előnyösen nem immunogének, és a plazmafehérjék saját biológiai aktiválásuk révén a betegekben káros mellékhatásokat nem idéznek elő.

A találmány szerint előállított vízdoldható polipeptideket előnyösen a konstans tartomány szintjén konjugáljuk immunoglobulinokkal. Előnyösen G típusú, célszerűen G1 típusú immunoglobulint használunk.

Az immunoglobulinok és néhány variánsuk ismert, ezek sok képviselőjét rekombináns sejttenyészetekkel állítják elő [Kohler és társai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2197 (1980), Morrison és társai: Ann. Rev. Immunol. 2, 239 (1984)].

Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon natív receptora extracelluláris részének aktivitásával rendelkező polipeptidek C-terminális végükön a könnyű lánc vagy nehéz lánc konstans tartománya N-terminális végződésével lehetnek konjugálva.

Ily módon a variábilis tartomány helyettesíthető, és legalább a nehéz lánc konstans tartományának CH2 és CH3 átmeneti tartománya funkcionálisan aktív formában megtartható.

Erre a célra a megfelelő DNS-szekvencia kialakítható, és a rekombináns sejttenyészetekben kifejezhető.

Az immunoglobulinok és az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon oldható receptoránál a plazmában hosszabb felezési időt mutató más polipeptidek ugyanígy konjugálhatók a fenti receptorral és variánsaival.

Az interferon receptor extracelluláris része legfeljebb 427–436 aminosavat tartalmaz, a kezdeti metionintól kiindulva (lásd az 1. ábrát).

A rögzítési tartományt magában foglaló sejt-tartományt tartalmazó szekvenciákat általában az immunoglobulinok szekvenciájával konjugáljuk.

A konjugáció pontos helye nem döntő jelentőségű tényező. A fentiekben megjelölt kötődési helyek csupán tájékoztató jellegűek, és az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon oldható receptora kiválasztódási vagy rögzítési jellemzőinek optimalizálása céljából a konjugáció számára az oldható interferon más szomszédos helyei is választhatók. Az optimális hely szokásos kísérletek segítségével határozható meg.

Általában azt találtuk, hogy a hibridek kifejeződnek a sejtben, a rekombináns gazdasejtek szekréciójának mértéke azonban bizonyos fokig változó. Az alábbi táblázatban különböző kapott immunoglobulin-interferon-receptor-fúziókat mutatunk be.

- |    |                                                       |
|----|-------------------------------------------------------|
| a) | RCI                                                   |
| b) | (RCI) <sub>2</sub>                                    |
| c) | (RCh) <sub>2</sub>                                    |
| d) | (RCI <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (RCh) <sub>2</sub> , |

ahol „R” az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon oldható receptornak a rögzítés helyét tartalmazó extracelluláris szakaszának egy részét jelenti, míg CI és Ch rendre a humán immunoglobulin könnyű láncának és nehéz láncának konstans tartományát jelenti. A fenti szerkezetek csupán a fő szerkezeti jellemzőket mutatják be, és például a közös (J) tartományt vagy az immunoglobulinok más szakaszait vagy a diszulfidhidakat nem mutatják. Ha a megkötési aktivitáshoz ilyen szakaszokra szükség van, úgy ezeknek olyan helyzetben kell jelen lenniük, amelyet az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon oldható receptorokban, az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon immunoreceptorokban vagy az immunoglobulinban a természetben elfoglalnak.

Ezek a példák a különböző ligandum/receptor-helyeket tartalmazó bifunkcionális hetero-antitestek olyan képviselői, ahol a VhCh immunoglobulin egy előre meghatározott antigénhez képes kapcsolódni. Más osz-

tályokba tartozó immunoglobulinok nehéz láncainak felhasználása esetén komplexebb szerkezetek keletkeznek (pl. IgM, IgG2, 3, 4, IgA, IgE, IgD, előnyösen IgG1).

Előnyös hibridek keletkeznek olyan oldható  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptor N-terminálisának fúziójával, amely az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon liganduma számára kötődési helyet az immunoglobulin G1-t befolyásoló funkciót tartalmazó antitest Fc C-terminális részében tartalmaz. A példákban ilyen hibrideket is bemutatunk.

Az ilyen hibridek jellemzően az oldható  $\alpha$ - vagy  $\beta$ -interferon receptor első 436 vagy 427 aminosavját tartalmazzák C-terminális végével a K-lánc vagy a G1-lánc konstans tartományához kapcsolva. Az 1. ábrán bemutatott oldható  $\alpha$ - vagy  $\beta$ -interferon receptort kódoló DNS-t a PCR-reakció [Polymerase Chain Reaction, lásd R. K. Saiki és társai: Science 239, 487–491 (1988)] és megfelelő restrikciós enzimekkel való emésztések kombinálásával szintetizálhatjuk, a példákban részletesen leírtak szerint.

Az (a/b) IFN-receptor cDNS-ének szekvenciájában az 5' végződéstől lefelé előre meghatározott helyeken komplementer oligonukleotidokat alkalmazunk, a 2. ábrán bemutatott szekvenciának megfelelően.

A PCR-reakció templátjaként teljes cDNS-t [Uzé és társai: Cell 60(2), 225–234 (1990)] vagy egy lambda bakteriofágot tartalmazó plazmidot alkalmazunk. Kereskedelmi forgalomban beszerezhető cDNS-könyvtár is felhasználhatunk. A cDNS-fragmens továbbá teljes RNS-ből vagy jól ismert módszerekkel előállított polis+RNS-ből közvetlenül is szintetizálható [lásd O. Ohara és társai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5673–5677 (1989), J. Delort és társai: Nucl. Acid Res. 17, 6439–6448 (1989)]. A cDNS- vagy RNS-könyvtár emberi sejtekből (pl. Daudi, Namalwa) vagy szervekből (pl. emberi lép) is kialakítható lényegében azonos eredménnyel.

Noha az interferon receptor egyedi polipeptidnek tűnik, szekvenciájának mégis létezhetnek bizonyos allélikus változatai.

A DNS-fragmenst egy immunoglobulin (ha a humán gyógyászatban felhasználható terméket kívánunk kialakítani, előnyösen egy humán immunoglobulin) könnyű vagy nehéz láncának konstans tartományát kódoló DNS-be illesztjük be.

Az immunoglobulinokat kódoló DNS-ek ismertek, és a kereskedelembe beszerezhetők vagy szintetizálhatók [lásd például Adams és társai: Biochemistry 19, 2711–2719 (1980), Gough és társai: Biochemistry 19, 2702–2710 (1980), Dolby és társai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6027–6031 (1980), Rice és társai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7862–7865 (1982), Falkner és társai: Nature 298, 286–288 (1982), Morrison és társai: Ann. Rev. Immunol. 2, 239–256 (1984)].

A hibrideket kódoló DNS-eket előnyösen a gazdasejtekbe transzfektáljuk kifejezésük céljából.

Ha a gazdasejt már transzfekció előtt nehéz immunoglobulin-láncokat termel, úgy a bifunkcionális hetero-antitestek termelése céljából elegendő az oldható  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptorok könnyű láncait tartalmazó hibridet transzfektálni. Hasonlóan, ha a gazdasejt már

könnyű láncokat kifejez, úgy az oldható  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptorok nehéz láncait tartalmazó hibridet kódoló DNS transzfektálható a bifunkcionális antitest termelése céljából. Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon kötődési helyét magában foglaló egy vagy több láncot és változtatható tartományokat magában foglaló egy vagy több láncot tartalmazó bifunkcionális immunoglobulinok kettősen specifikusak, és pedig  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferonnal, valamint egy előre meghatározott antigénnel szemben. Ezeket a fentiekben ismertetett eljárásokkal vagy in vitro módszerekkel állíthatjuk elő. Az utóbbi esetben például a hibrid F(ab)2 fragmenseit ismert módszerekkel (lásd például a 4 444 878 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást) alakítjuk ki.

Bifunkcionális antitestek alternatív módszerrel oly módon állíthatók elő, hogy a kívánt antigénnel szemben specifikus antitesteket kiválasztó B-sejteket vagy hibridómákat fuzionálunk immunoglobulin/oldható  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptor-hibridet termelő sejtekkel (pl. mielómákkal). A bifunkcionális antitestek az ilyen hibridómák tenyésztésének felülűszojából nyerhetők ki.

A találmány továbbá a fentiekben ismertetett vízoldható polipeptideket vagy azok második polipeptiddel képezett hibridjeit kódoló DNS-szekvenciák előállítására vonatkozik. Ezeket a DNS-szekvenciákat úgy állítjuk elő, hogy a megfelelő DNS-fragmenseket és/vagy nukleinsavakat ismert géntechnológiai módszerekkel a helyes sorrendben összekapcsoljuk egymással, és a kapott terméket PCR-el (polimeráz láncreakció) megszorozzuk.

Az emlős  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferonokkal szemben nagy affinitást mutató polipeptidek példáulként a primátok oldható  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptorait, továbbá a humán, patkány-, egér-, kutya-, macska-, szarvasmarha-, ló- és sertés-eredetű oldható  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptorokat említjük meg. Az ilyen polipeptideket kódoló DNS-szekvenciák számos területen alkalmazhatók. Közelebből ezek a szekvenciák vagy szekvenciárészek, valamint szintetikus vagy félszintetikus másolataik más cDNS-könyvtárak vagy humán vagy állati genomknyvtárak szűrésére alkalmazhatók, az oldható  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptorokhoz hasonló más DNS-szekvenciák hibridizáció útján történő szelektálására. Az ilyen DNS-ek, fragmenseik, valamint szintetikus vagy félszintetikus másolataik az oldható  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptorok variánsait képezik, és kiindulási anyagokként használhatók más variánsok mutáció útján történő előállításához. Ezek a mutációk vagy nem képesek megváltoztatni a mutált kodonok által kódolt aminosavak szekvenciáját, vagy megváltoztatják az aminosavakat. Mindkét típusú mutáció előnyösen hasznosítható az oldható  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptorok termelése vagy felhasználása szempontjából. Ezek a mutációk például nagyobb termelékenységet, egyszerűbb tisztítást vagy nagyobb kötőkapacitást eredményeznek.

Egy alkalmas DNS-szekvencia példaként a 2. ábrán bemutatott 1–1343. nukleotidból álló szekvenciát említjük meg.

A természetes  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptor oldható formáinak variánsait kódoló DNS-t előnyösen olyan formában alkalmazzuk, amely lehetővé teszi annak kifeje-

ződését egy transzkripciós egységben, a tervezett gazdasajttal kompatibilis emlősök, mikroorganizmusok vagy vírusok transzkripciójára és transzlációjára szolgáló vezérlőelemek vezérlése alatt. A megfelelő sejtek transzformálása, transzfektálása vagy infektálása után ezek a vektorok lehetővé teszik a rekombináns polipeptid kifejeződését. A természetes  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptor oldható variánsai megfelelő promotorok vezérlése mellett kifejezhetők emlősök, élesztők vagy baktériumok sejtjeiben vagy más sejtekben. Baktérium-, gomba-, élesztő- vagy emlős-gazdasejtek klónozására és kifejezésére felhasznált vektorokat Pouwels és társai írtak le [Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985], a szakkönyv releváns részeire referenciaként hivatkozunk. A kifejező vektor adott esetben, azonban nem szükségszerűen tartalmazhat egy replikációs helyet, valamint egy vagy több, a transzformált sejtek között választást lehetővé tevő szelekciós marker-szekvenciát is.

A fent ismertetett polipeptideket kódoló DNS-be variációk is illeszthetők be, ezek azonban nem változtathatják meg a leolvasási keretet, és nem hozhatnak létre a kifejezés szempontjából káros szekunderszerkezeteket termelő komplementer szekvenciákat.

A természetes interferon receptor oldható variánsainak minősülő polipeptidek kötési aktivitása lényegében megegyezik a természetes receptoréval, azonban – miként már közöltük – a természetes receptorétól eltérő (például javított) jellemzőkkel rendelkező variánsok is kialakíthatók.

Bár a mutáció hely rögzített, maga a mutáció nem az. Így például az adott helyen lejátszódó mutáció teljesítményének optimalizálása céljából a kodon vagy a célzott tartomány véletlenszerűen mutálható, és a kapott polipeptid-variánsok a szekunder jellemzők optimális kombinációjára szűrhetők. A helyettesítéses mutációknak a DNS adott helyeire történő beillesztésére szolgáló módszerek jól ismertek, ilyen például az M13-rendszer. A humán receptort kódoló DNS bármely ismert eljárással előállítható, szekvenciáját a 2. ábra mutatja be.

A fentiekben ismertetett polipeptid szekvenciák klónozására általában prokariótákat alkalmazhatunk. Különösen hasznosnak bizonyult az E. coli 294 (ATCC 31446) törzs, azonban más törzseket, így az E. coli X 1776 (ATCC 31537) törzset is felhasználhatjuk.

Miként már közöltük, az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptor oldható variánsai és azok hibridjei baktériumok, élesztők vagy emlősök sejtjeiben vagy más típusú sejtekben fejezhetők ki megfelelő promotor vezérlése mellett. A találmány tárgyát képezi továbbá az ilyen polipeptideket kifejező sejtek előállítása. Ezeket a sejteket úgy állítjuk elő, hogy a gazdasejtet az adott polipeptidet kódoló DNS-szekvenciával transzfektáljuk.

A rekombináns fehérjék kifejezésére prokariótarendszerek – például E. coli – alkalmazhatók. Az E. coli tipikusan a pBR322 (ATCC 37017) egy származékának felhasználásával transzformálható, ez egy E. coli-törzsből leszármaztatható plazmid [Bolívar és társai: Gene 2, 95 (1977)]. A pBR322 ampicillin- és tetraciklin-rezisz-

tencia-géneket tartalmaz, és egyúttal a transzformált sejtek azonosításának egyszerű eszköze. A pBR322-plazmidnak vagy más mikrobaplazmidoknak a rekombináns DNS-szerkezetben általánosan használt kifejeződést vezérlő szekvenciákat is kell tartalmazniuk, vagy ezeket úgy kell módosítani, hogy tartalmazzanak ilyen vezérlő szekvenciákat.

A fenti vezérlőelemek példáiként a következőket soroljuk fel: laktóz (lac) promotor (ATCC 37121) [J. Mol. Appl. Genet. 1, 139–147 (1989)],  $\beta$ -laktamáz promotor [Chang és társai: Nature 275, 615 (1987)], triptofán promotor [Miozzari: J. Bact. 133, 1457–1466 (1978)], továbbá hibrid promotorok, például tac (ATCC 37138) [H. de Boer és társai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21–25 (1983)]. Ide tartoznak még a kereskedelmi forgalomban lévő vektorok, így a lambda fág promotort és hőre labilis c1857-represszort tartalmazó trc vagy a pPL-lambda promotort tartalmazó pKK223–3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Svédország). A vezérlőelemek köre azonban nem korlátozódik a példaként fent felsoroltakra.

Más funkcionális promotorok is alkalmasnak bizonyultak. A DNS-szekvenciák általánosan ismertek, így ezek megfelelő kötőelemek vagy adapterek felhasználásával konjugálhatók az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptor oldható variánsait kódoló DNS-sel. A bakteriális rendszerek promotorai ezenkívül egy úgynevezett Shine-Dalgarno (SD) szekvenciát is tartalmaznak, az antigént lefelé kódoló DNS-hez operatíván kapcsolva.

A megfelelő gazdatörzs transzformálása és a transzformált gazdatörzs megfelelő tenyésztésűségig történő tenyésztése után a kiválasztott promotort alkalmas módon (például a hőmérséklet megnövelésével vagy kémiai indukcióval) de-represszáljuk, és a mikroorganizmusokat tovább tenyésztjük. Ezután a mikroorganizmusokat – rendszerint centrifugálással – összegyűjtjük, kémiai vagy fizikai úton lizáljuk, és az extraktumot továbbtisztításra elkülönítjük.

A mikroorganizmusokat maximális növekedést biztosító körülmények között levegőztetve, erős keverés közben fermentáljuk egy például 10 literes fermentorban. Előnyösen habzásgátlót használunk. A törzstenyészetet Mott és társai által leírt [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 88 (1985)] szuperindukciós táptalajon 30 °C-on tenyésztjük.  $A_{600}=5-6$  abszorpciónak megfelelő tenyésztésűség elérésekor a hőmérsékletet 42 °C-ra növelve de-represszáljuk a promotort, majd 2–20 (előnyösen 3–6) órával a hőmérsékletváltoztatás után összegyűjtjük a sejteket. A mikroorganizmus-masszát először szűrővel vagy más módon tömörítjük, majd 10 000 g gyorsuláson 4 °C-on 10 percig centrifugáljuk, végül a kapott pelletet gyorsan megszilárdítjuk. A baktériumtenyészetben termelődött rekombináns fehérjét a pelletet extrakciójával, majd az extraktum egy vagy több lépésben végzett betöményítésével, sómentesítésével vagy ioncserés vagy kizárásos kromatografálásával különítjük el.

Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptor oldható variánsainak kifejezésére felhasznált mikroorganizmusokat bármely alkalmas módszerrel (például ciklikus fagyasztással-fel-

engedetetéssel, mechanikai feltöréssel vagy vegyszeres úton) lizálhatjuk. Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptor oldható variánsai bizonyos mértékig aggregációra hajlamosak. Az aggregátumképződés csökkentésére az extrakciót és a tisztítást detergens (például Tween 80 vagy Triton X100) jelenlétében végezhetjük.

Olyan vízdoldható polipeptidek esetén, amelyek DNS-szekvenciája nem metioninnal kezdődik, az iniciáló szignál felfelé egy további metionin aminosav belépését eredményezi, és ez képezi a termék N-terminális részét. Noha ezek a további N-terminális metionint tartalmazó termékek is felhasználhatók a találmány szerinti eljárásokban, előnyösebb ezt a metionint előzetesen eltávolítanunk. Az N-terminális metionin eltávolítására szolgáló standard in vivo és ex vitro módszerek jól ismertek.

A korábbiakban meghatározott polipeptidek vagy hibridek kifejezésére élesztőrendszerek, így előnyösen Saccharomyces-típusok (köztük a könnyen hozzáférhető *S. cerevisiae*) is felhasználhatók.

Az alkalmas élesztővektorok általában a következő elemeket tartalmazzák: replikációs origó, az élesztő és *E. coli* transzformálását lehetővé tevő szelekciós marker [például az *E. coli* ampicillin-rezisztencia-gén és a *S. cerevisiae* trp1 génje, ami egy triptofán jelenlétében növekedésre képtelen élesztőmutáns (ATCC 44076) szelekciós markerje], és egy az élesztőben szuperexpresszált génből kapott promotor a gén felfelé való transzkripciójának indukálására. Élesztő-gazdaszervezetek számára alkalmas promotorok például a következők: a 3-foszfoglicerát-kináz vagy más glikolízis enzimek promotora, a savas foszfátáz promotora (például PH05), és az  $\alpha$ -típusú kapcsolófaktorok promotora. Élesztő-gazdaszervezetek számára alkalmas promotorok továbbá a promotor régiók, így a 2-alkohol-dehidrogenáz [Russel és társai: J. Biol. Chem. 258, 2674 (1982)]. A promotor és a felfelé irányulva kifejezendő struktúrgén közé egy szignálpeptid (például egy heterológ élesztőfehérje kiválasztását lehetővé tevő faktor szignálpeptidje) is beiktatható [lásd Bitter és társai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5330 (1984)]. Az élesztő transzformálásának módszerei szakember számára jól ismertek. Egy jellemző módszert Hinnen és társai ismertettek [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 (1978)], amellyel trp+ transzformánsok szelektálhatók egy 0,67% nitrogéntartalmú élesztőbázist, 0,5% kazamino-savat, 2% glükózt és 10  $\mu$ g/ml uracilt tartalmazó szelekciós táptalajon. A PH05-promotort magában foglaló vektorokat tartalmazó transzformált gazdatörzsek kezdetben dús táptalajban képezett előtenyészet formájában tenyésztethetők, majd a táptalaj szervesen foszfátkoncentrációjának csökkentésével de-represszálhatók. A törzset szokásos módszerekkel tenyésztjük.

A rekombináns polipeptidet oly módon nyerjük ki, hogy a glükózidáz enzimessal és ezt követő, detergenssel végzett kezeléssel vagy mechanikai úton (pl. préseléssel) lizált sejt-pelletet extraháljuk, majd egy vagy több lépésben betöményítjük, sómentesítjük, ioncserélésnek vagy kizárásos kromatografálásnak vetjük alá. Ha a polipeptid a periplazmatikus térbe választódik

ki, a sejteket a membrán külső rétegét károsító és a rekombináns polipeptid felszabadulását lehetővé tevő vegyszerrel (pl. EDTA-val) kezeljük, és ezután nyerjük ki a polipeptidet. Ha a polipeptid a táptalajba választódik ki, azt közvetlenül kinyerhetjük.

A korábbiakban meghatározott polipeptidek vagy hibridek emlőssejtekben is kifejezhetők alkalmas promotorok vezérlése alatt. Emlős  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptor oldható variánsainak termelésére sejtmentes rendszereket is felhasználhatunk, a találmány szerint kialakított DNS-ekből leszármaztatható RNS-ek alkalmazása mellett.

Az emlős gazdasejtekben történő kifejezést vezérlő promotorok különböző forrásokból nyerhetők. Ilyenek például a vírus (így polioma, majom SV40-vírus, adenovírus, retrovírus hepatitis B citomegalovírus) genomokból származó promotorok, egyes emlős promotorok (például a humán  $\beta$ -globin gén DNS-áz I-ére érzékeny helyeket tartalmazó promotor), és egyes rovarvírus-promotorok (így a baculovírus-rendszer poliéder promotor). Állati sejtekben való kifejezésre előnyösen használható az adenovírus-2 kései fő promotorjából leszármaztatható vezérlőtartomány.

Az SV40 korai és kései tartományait előnyösen az SV40-vírusból különítjük el, a vírus replikációs origóját tartalmazó restrikciós fragmens formájában [lásd Fiers és társai: *Nature* 272, 113 (1978)].

A humán citomegalovírus korai közvetlen tartományát Hind IIIE restrikciós fragmens formájában izoláljuk [Greenaway P. J. és társai: *Gene* 18, 356–360 (1982)]. Az adenovírus-2 kései promotorját a 8–17. térképegységeket tartalmazó Hind III restrikciós fragmens alakjában izoláljuk [S. Hu és J. L. Manley: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 820–824 (1981)]. Szürlőtípusú sejteredetű eukarióta promotorok is hasznosaknak bizonyultak.

Eukarióta-kifejező vektorokban a transzkripciót úgy növeljük, hogy a promotoron kívül aktivátorokat tartalmazó szekvenciákat is beiktatunk. Az aktivátorok DNS-elemek, amelyek azonos oldalon hatnak, néhány-szor tíz–háromszáz bázispárt tartalmaznak, és fokozzák a promotor transzkripciót iniciáló képességét. Számos aktivátorról (globin, elasztáz, albumin, inzulin stb.) ismert, hogy emlősgénekre hat. Rendszerint azonban eukarióta sejteket fertőző vírusok aktivátorait használjuk, amelyek közül példaként a következőket soroljuk fel: a replikációs origó kései oldalának SV40 aktivátora (100–270 bázispár), a citomegalovírus korai közvetlen promotorjának aktivátora, a replikációs origó kései oldala poliomájának aktivátora, a replikációs origó kései oldala poliomájának aktivátora és az adenovírus aktivátora. Az eukarióta sejtekben (élesztők, gombák, rovarok, növények, állatok, ember) használt kifejezővektorok továbbá a mRNS kifejezésének befolyásolására képes faktorok transzkripciójának hasításához és lezárásához szükséges szekvenciákat is tartalmazhatnak. A kifejező vektorok szelekciós gént tartalmaznak.

Az emlőssejtek szelekciós markerjei közül példaként a dihidrofolát redukáz (DHFR), a timidin-kináz

és a neomicint említjük meg. Ha ilyen szelekciós markereket transzfektálunk emlős gazdasejtbe, a szelekciós nyomás hatásának kitett transzformált sejt túlélésre képessé válik. Rendszerint kétféle típusú szelekciós rendszer használatos. Az egyik típus olyan mutáns sejtvonalakot alkalmaz, amelyek növekedése attól függ, hogy a táptalaj tartalmaz-e egyes meghatározott anyagokat vagy sem. Ilyenek például a CHO DHFR-sejtek vagy a rágszálóeredetű LTK-sejtek, amelyek timidin vagy hipoxantin hozzáadása nélkül nem képesek növekedni. Ha ezekbe a sejtekbe transzfektálással funkcionális DHFR- vagy TK-gént építünk be, a sejtek túlélőképessé válnak, míg a DHFR- vagy TK-génnek nem transzformált sejtek változatlanul nem növekednek a timidinnel vagy hipoxantinnal ki nem egészített táptalajon.

A másik megoldás a domináns szelekció, ami nem igényel mutáns sejteket. Ekkor például a sejtbe a sejtet egy toxikus anyaggal szemben rezisztenssé tevő gént transzfektálunk, majd azt kifejezzük [lásd Southern és Berg: *J. Molec. Appl. Genet.* 1, 327 (1982), Mulligan és Berg: *Science* 20, 1422 (1980), Sugden és társai: *Mol. Cell. Biol.* 5, 410–413 (1985)].

A sejt bizonyos kromoszómatartományainak növelését vagy replikációját amplifikációnak (sokszorozás) nevezzük, és ezt egy szelekciós agens [például a DHFR-t inaktiváló metotrexát (MTX)] felhasználásával hozzuk létre. Az MTX mennyiségének növekedésével nő a DHFR-gén amplifikációja vagy másolatszama, ami a DHFR-termelés növekedését eredményezi. Az amplifikáció foka a táptalaj MTX-koncentrációjának növekedésével nő. A kívánt gén amplifikációját a kívánt gén és a kromoszómában kointegrált DHFR-gén ko-transzfekciójával érjük el. A kívánt gén és a DHFR-gén ko-amplifikációja után a kívánt fehérjét kódoló gén több kívánt fehérjét fejez ki.

A korábbiakban meghatározott oldható interferon receptor-variánsok kifejezésére a találmány szerint gazdasejtként előnyösen emlőssejteket, köztük majomvesesejteket (COS-7, ATCC CRL 1651) és kínaihiórcsögsejteket [CHO-, DHFR-, Urlaub és Chasin: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4216 (1980)] használunk.

Az emlőssejtek transzformálására szolgáló módszerek jól ismertek. Egy előnyös módszert, amelynek során a DNS-t kalcium-foszfáttal csapják ki, Graham F. és van der Eb ismertetett [Virology 52, 456–457 (1973)]. Egy másik módszer szerint elektroportálást végeznek [G. Chu és társai: *Nucl. Acid. Res.* 15, 1311–1326 (1987)]. Más transzfekciós módszereket is alkalmazhatunk, például a magba való befecskendezést vagy a protoplasztokkal végzett fúziót.

A kívánt vezérlő és kódoló szekvenciákat tartalmazó kifejező vektorokat jól ismert standard módszerekkel alakítjuk ki [lásd például Maniatis T. és társai: *Molecular Cloning*, 133–134 (Cold Spring Harbor, 1982), továbbá Ausubel és társai (szerk.): *Current Protocols in Molecular Biology* (kiadó: Greene Publishing Associates és Wiley Interscience, 1987)]. A DNS plazmidjait vagy fragmenseit elkülönítjük, hasítjuk, méret szerint osztályozzuk, majd a kívánt formára hasítjuk.

A helyes plazmidszekvenciákat ligációs keverékekkel *E. coli* HB101 vagy *E. coli* K12 194 (ATCC 31446) törzsben való transzformáció után meghatározzuk. Az ampicillinnel szemben rezisztens transzformánsokat kiválasztjuk. A plazmidokat elkülönítjük a transzformánsokból, és jól ismert módon restriktációs enzimekkel való kezeléssel vagy szekvenciameghatározással elemezzük [lásd Messing és társai: *Nucl. Acid. Res.* 9, 309 (1981) és Maxam és társai: *Methods in Enzymology* 65, 499 (1980)].

A gazdasejteket általában kifejező vektorokkal transzformáljuk, majd olyan alkalmas táptalajban tenyésztjük, amely a promotor kifejezését indukáló anyagokat, a transzformánsok szelektálására szolgáló komponenseket vagy a gének amplifikációját elvégző anyagokat tartalmaz. A kiválasztott kifejező tenyészethez alkalmazandó fermentációs körülmények (pl. hőmérséklet, pH) szakember számára jól ismertek.

A találmány szerint előállított polipeptideket rekombináns gazdasejtek felülüzőiből izoláljuk és tisztítjuk. A felülüzőkat rendszerint ultraszűrővel töményítjük be, majd ioncserés kromatográfiával vagy immunoaffinitással tisztítjuk a várt polipeptidek adszorbeálása és azt követő eluálása céljából. Az antigén aggregátumok képzésére erősen hajlamos. Ezért a tisztítási műveleteket előnyösen detergens (pl. Tween 80, Triton X100 vagy CHAPS) jelenlétében végezzük. A végterméket fehérjékkel (pl. albuminnal) stabilizáljuk. Adott esetben ezek a fehérjék detergenst tartalmazhatnak.

Megjegyezzük, hogy a kifejezés vezérlésére szolgáló összes vektor vagy szekvencia és az összes gazdasejt nem működik egyformán minden kifejező rendszerben. A megfelelő vektorok, kifejezést vezérlő szekvenciák és gazdasejtek kiválasztása a jelen találmány oltalmi körén belül a szakember köteles tudásához tartozik. Az alkalmas egysejtű gazdaszervezetek megválasztásakor például a következő tulajdonságokat kell figyelembe venni: a kiválasztott vektorral való összeférhetőség, a találmány szerint előállított DNS-szekvenciák által kódolt termék toxicitása, a szekréciós jellemzők, a fehérjehajtogatató jellemzők megfelelősége, a fermentációs követelmények, a találmány szerint előállított DNS-szekvenciákkal való kifejezés után nyert rekombináns termékek tisztíthatóságának egyszerűsége.

A fenti paraméterek figyelembevételével szakember könnyen kiválaszthatja azokat a vektorrendszer/kifejezést vezérlő rendszer/ gazdasejt-kombinációkat, amelyek a találmány szerint előállított DNS-szekvenciákat állati sejtek (pl. CHO- vagy COS-7-sejtek) nagyléptékű fermentációja vagy tenyésztése során kifejezik.

Miként már közöltük, a találmány szerint előállított polipeptidek immunomodulátorokként (elsősorban immunosuppresszánsokként) hasznosíthatók, és a gyógyászatban például autoimmun-betegségek kezelésére, valamint az átültetések kilökődésének megakadályozására alkalmasak. Ezekre a célokra a találmány szerint előállított polipeptideket elő-

nyösen gyógyászati készítmények formájában alkalmazzuk.

A találmány tárgya tehát továbbá eljárás gyógyászati készítmény előállítására oly módon, hogy egy a találmány szerint előállított vízzoldható polipeptidet gyógyászati alkalmas hordozóanyagok, hígítószer-  
5 rek és/vagy egyéb segédanyagok felhasználásával, szokásos gyógyszer technológiai műveletekkel gyógyászati készítménnyé alakítunk.

10 A gyógyászati készítmények például szilárd, fél-szilárd és folyékony kompozíciók, így tabletták, pilulák, porok vagy injekciós vagy infúziós oldatok lehetnek. Az előnyös kikészítési forma az adagolás módjától és a terápiás felhasználástól függ. A találmány szerint előállított gyógyászati készítményeket más gyógy-  
15 ázatilag jelentős polipeptidek alkalmazásához hasonlóan használhatjuk fel, és a készítmények formája is a más polipeptideket tartalmazó készítményekhez hasonló. Így a polipeptidet például liofilizált alakban tá-  
20 rolnhatjuk, amiből a felhasználásra kész gyógyszer közvetlenül a felhasználás előtt alakítjuk ki steril víz hozzáadásával, majd ezt szokásos módon, így paren-  
25 terálisan (például szubkután, intravénás, intramuszkuláris vagy intralezionális úton) adjuk be. A hatóanyagok hatóanyag dózisa napi 1–5 mg/testtömeg kg nagyság-  
rendű lehet, de megjegyezzük, hogy ennél kisebb vagy a felső határt kétszeresen meghaladó dózisok is káros  
következmények nélkül beadhatók.

A találmány szerint előállított gyógyászati készí-  
30 ményeket károsan abnormális  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon-ter-  
melésben szenvedő betegeknek például a következő betegségek kezelése céljából adhatjuk be: lupus  
erythematosus, Bechet-szindróma, apláziás anémia,  
diabetes mellitus, sclerosis multiplex, reumatoid arth-  
35 ritis, súlyos immunhiányos betegségek, AIDS. A találmány szerint előállított gyógyászati készítmények to-  
vábbá az immunaktivitást módosító tulajdonságaik (pl.  
NK-sejtek aktiválása vagy hisztokompatibilis antigén-  
nek kifejezése) révén olyan betegek kezelésére is alkal-  
40 masak, akiknél fennáll az átültetett szervek vagy szö-  
vetek kilökődésének veszélye.

A találmány szerint előállított gyógyászati készí-  
tmények hatóanyagai természetük és hatásmechanizmusuk  
révén mentesek a korábban ismert hatóanyagok  
45 (például a kémiai immunosuppresszánsok, így a  
glükokortikoidok) általános toxicitásától, ezért a jelen-  
legi klinikai gyakorlatban használatos gyógyszerekhez  
képest jelentős előrelépést jelentenek. A jelenleg hasz-  
nálatos gyógyszerek közül példaként az immunrendszer  
50 összes elemének sejtosztódását és citokinszintézisét  
gátló immunosuppresszorokat és származékaikat (így  
az adrenális kortikoszteroidokat), továbbá a ciklosporin  
nevű gyűrűs undekapeptidet említjük meg [az utóbbi  
szelektíven gátolja az immunrendszer aktiválódását,  
55 ami ugyan nyilvánvaló haladást jelent, de emellett szá-  
mos nem immunológiai toxikus hatása is van, lásd: *N. Engl. J. Med.* 321 (25), 1725–1738 (1989)].

A találmány szerint előállított polipeptidek az  $\alpha$ - és  
 $\beta$ -interferontól eltérő agonisták vagy antagonisták mű-  
60 ködének szabályozására is felhasználhatók.

A találmány szerint előállított polipeptidek tisztított állapotban arra is felhasználhatók, hogy meghatározzuk az oldható  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptorok kötődési helyének tercier szerkezetét. A tercier szerkezet ismerete előfeltétele az olyan molekuláris modell kialakításának, amiből a gyógyászatban immunosuppresszorként felhasználható antagonisták vagy vírusellenes vagy tumorelleses szerként alkalmazható agonisták szintézisében hasznosítható szerkezeti következtetések vonhatók le.

A találmány szerint előállított polipeptideket diagnosztikai célokra is felhasználhatjuk.

A diagnosztikai célú felhasználások egyik példája az interferon receptor elleni antitestek kialakítása oly módon, hogy melegvérű állatoknak a találmány szerint előállított polipeptidet és egy gyógyászatiilag alkalmazható szubsztrátumot adunk be, majd az immunreakció lezajlása után az állatokat kivézzük, és a vérből elkülönítjük az antitesteket. Ezeket a műveleteket szokásos immunbiológiai módszerekkel végezzük. Az így kialakított antitesteket például különféle diagnosztikai mérésekhez vagy farmakológiai modellvizsgálatokhoz használhatjuk fel.

A diagnosztikai célú felhasználások másik példája az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptor elleni antitestek jelenlétének kimutatása biológiai mintákban. Az antitesteket önmagában ismert immunbiológiai módszerrel mutatjuk ki, amelynek lényege, hogy a vizsgálandó biológiai mintát az antitesttel komplexet képező anyaggal hozzuk érintkezésbe a komplex kialakulását lehetővé tevő körülmények között, majd kimutatjuk a komplex jelenlétét. A találmány értelmében az antitesttel komplexet képező anyagokként a találmány szerint előállított polipeptideket használjuk.

Megjegyezzük, hogy ha kifejezetten mást nem közöltünk, a „találmány szerint előállított (vízoldható) polipeptid” megjelölésen a leírás bevezető részében felsorolt polipeptidek szabad és második polipeptiddel hibridizált formáit egyaránt értjük.

Találmányunk további részleteit a következő példákban ismertetjük anélkül, hogy az oltalmi kört a példákra korlátoznánk.

#### 1. példa

*Emlőssejtek által kiválasztott natív  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferonok vízoldható receptorának és variánsainak kifejezésére szolgáló vektorok felépítése*

##### 1. szekció

*Natív interferon receptor kifejezésére szolgáló plazmidok felépítése*

Teljes cDNS-t tartalmazó és a natív  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferonok receptorát kódoló DNS-fregmenseket PCR-reakció felhasználásával szintetizálunk. Templátként a 2. ábrán bemutatott  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferonok receptora cDNS-ének teljes hosszát tartalmazó lambda ZAP-bakterofágot alkalmazunk és a reakció primerjeként specifikus oligonukleotidok szolgálnak. Közelebbről, a lambda ZAP-bakterofágot egy szintetikus oligonukleotid-párral inkubáljuk, amely a cDNS 5' végén levő antiszemszállal komplementer, az

oligo 0:5'-CCGGCTGCAGGGATCTGCGGCG  
GCTCCAG-3'

szekvenciájú oligonukleotidból és a cDNS 3' végén levő kódoló szállal komplementer,

5 az

oligo-1:3'-CAAAAAGTCGTCCTCAATGTG  
ACCATGGCC-5'

szekvenciájú oligonukleotidból áll.

Az oligonukleotidokat oly módon építjük fel, hogy a PCR-reakció befejeződése után a kapott DNS-fragmensek kettős szála a PstI-enzim számára az 5' végződésen és a KpnI számára a 3' végződésen restriktációs helyet tartalmaz.

A PCR-reakciót 100  $\mu$ l reakcióterfogóban PCR-pufferben végezzük el, amely 1-1 mM mennyiségben primereket, 100 pg lambda ZAP-bakterofágot és 1 egység Taq-polimerázt tartalmaz. A reakciókörülmények az alábbiak: 25 ciklus; egy ciklus 95 °C-on egy órán át végzett inkubálásból (denaturálás), 37-40 °C-on 3 per-  
20 cen át történő kezelésből (hibridizáció), majd 72 °C-on 4 per-  
25 cen át történő melegítésből (polimerizáció) áll. Az utolsó ciklus után a reakciót 72 °C-on 10 per-  
30 cen át folytatjuk, és a mintákat 4 °C-on tároljuk. A reakciótermékeket kloroformmal extraháljuk, majd etanolos kicsa-  
35 pás után a termékeket egymás után KpnI-el és PstI-el emésztjük. Az 1,7 kb fragmenst (1. fragmens) alacsony olvadáspontú agarózon végzett elektroforézis után összegyűjtjük és a pSVAdpAl kifejező vektorhoz kap-  
40 csoljuk.

A pSVAdpAl kifejező vektort a következőképpen építjük fel:

Az SV40-szekvenciákat a pSV2DHFR-plazmidból kapjuk [Subrami és társai: Molec. Cell. Biol. 1, 854-864 (1981)]. Ezek a replikációs eredetet, az  
35 aktivátort, a korai és kései promotorokat (PvuII-HindIII fragmensek) és a hasítóhelyei (donor és akceptor) által körülvevő antigén intronját, valamint a korai tartomány poliadenilezési helyét (Bgl II-Eco RI-fragmens) tartal-  
40 mazzák.

A 2-adenó kései fő promotor tartományát a pAdD26SVpA-plazmidból (EcoRI-PstI-fragmens) kap-  
45 juk [Kaufman és Shimke: P. A.: J. Mol. Biol. 159, 601-621 (1982)]. Ez a promotor, a tripartita vezetőt [Zain és társai: Cell. 16, 851 (1979)] és egy hibrid hasítóhelyet tartalmaz, amely a 2-adenó-donor hasítóhelyéből és az immunoglobulin változtatható tartománya akceptorhasító helyéből áll.

A többszörös klónozóhely a pUC18-plazmidban talá-  
50 lálttal azonos. Ez a PstI, Sal I, Acc I, Hinc II, Xba I, Bam HI, Xma I, Sma I, KpnI, SacI, Ban II, EcoRI számára restriktációs helyeket tartalmaz.

A plazmid az E. coli replikációs eredetét és az ampicillinrezisztens gént tartalmazza és a pML-plazmidból származtatták le [Lusky és Botchan: Nature 293,  
55 79-81 (1981)].

A pSVAdI-plazmidot egymás után KpnI-el és PstI-el emésztjük, majd foszfátazzal kezeljük és a plazmid fő részét tartalmazó fragmenst (2. fragmens) alacsony ol-  
60 vadáspontú agarózon végzett elektroforézissel izoláljuk. A 2. fragmenst az 1. fragmenshez kapcsoljuk és a

kapcsolt keveréket kompetens *E. coli* HB 101-sejtekbe transzfektáljuk. A transzformált tenyészetet ampicillin-tartalmú táptalajt tartalmazó Petri-csészékbe öntjük és az ampicillinrezisztens telepeket szelektáljuk. Ezekből a transzformánsokból a DNS-plazmidot elkészítjük és analizáljuk; az elemzés során a megfelelő inzert jelenlétét restriktációs enzimekkel vizsgáljuk és a szekvencia helyességének megerősítése céljából az 5' és 3' végződéseken az inzert kapcsolódásait szekvencia-analízissel határozzuk meg.

A natív sejtreceptor emlőssejtekben történő kifejezéséhez a pSVAdIFRpA-plazmidot alkalmazzuk.

5' vég oligo: 5'-CCGGCTGCAGGGATCTGCGGCGGCTCCCAG-3'  
szekvenciájú oligonukleotidot és a cDNS különböző helyein levő kódolószálal komplementer, valamely

3' vég oligo 1: 3'-CGTCCTTTATGGAGATTTACTCCATGGCC-5'

3' vég oligo 2: 3'-TCACTGCGACATACACTCACTCCATGGCC-5'

3' vég oligo 3: 3'-GTCAGACCTTTGTGCGGAAGTCCATGGCC-5'

3' vég oligo 4: 3'-GTCACACAGAAAGGAGTTTACTCCATGGCC-5'

3' vég oligo 5: 3'-CTCTGATGAATAACAGATACTCCATGGCC-5'

szekvenciájú oligonukleotidok közül egyet tartalmaznak.

Az oligonukleotidokat oly módon építjük fel, hogy a PCR-reakció befejeződése után a kapott kettős szálú DNS-fragmensek a PstI-enzim számára az 5' végződésen és a KpnI számára a 3' végződésen restriktációs helyet tartalmaznak.

A PCR-reakciót 100 µl reakciótérfogatban PCR-pufferben végezzük el, amely 1-1 µM mennyiségben primerket, 100 pg lambda ZAP-bakterofágot és 1 egység Taq-polimerázt tartalmaz. A reakciókörülmények az alábbiak: 25 ciklus; minden ciklus 95 °C-on egy percen át végzett inkubálásból (denaturálás), 37-40 °C-on 3 percen át végzett kezelésből (hibridizálás) és 72 °C-on 4 percen át végzett melegítésből (polimerizáció) áll. Az utolsó ciklus után a reakciót 72 °C-on 10 percen át folytatjuk, majd a mintákat 4 °C-on tároljuk. A reakciótermékeket kloroformmal extraháljuk, majd etanolos kicsapás után a termékeket egymás után KpnI-el és PstI-el emésztjük. A kívánt fragmenseket alacsony olvadáspontú agarózon végzett elektroforézis után összegyűjtjük. Az összegyűjtött fragmensek hossza hozzávetőlegesen a következő:

1. reakció (5' vég oligo + 3' vég oligo 1): 1,3 kb fragmens 3

2. reakció (5' vég oligo + 3' vég oligo 2): 1,3 kb fragmens 4

3. reakció (5' vég oligo + 3' vég oligo 3): 1,1 kb fragmens 5

4. reakció (5' vég oligo + 3' vég oligo 4): 0,9 kb fragmens 6

5. reakció (5' vég oligo + 3' vég oligo 5): 0,6 kb fragmens 7

A 3-7-ből származó DNS-fragmenseket külön-külön kapcsoljuk a pSVAdpAl kifejező vektorhoz.

A pSVAdl-plazmidot egymás után KpnI-el és PstI-el emésztjük, majd foszfátazzal kezeljük és a plazmid

## 2. szekció

Az α- és β-interferon receptorok kiválasztott variánsainak kifejezésére szolgáló plazmidok felépítése

A különböző karboxi-terminálisokat tartalmazó receptor különböző delécióit tartalmazó és a receptor kiválasztott formáit kódoló DNS-fragmenseket PCR-reakció felhasználásával szintetizálunk. Közelebről, a receptor teljes cDNS-ét tartalmazó lambda ZAP-bakterofágot primerként szolgáló különböző szintetikus oligonukleotid-párokkal inkubálunk, amelyek az 5' végen levő antiszemszállal komplementer, az

fő részét tartalmazó fragmenst (2. fragmens) alacsony olvadáspontú agarózon végzett elektroforézissel izoláljuk. A 2. fragmenst külön-külön kapcsoljuk a 3-7. fragmensekhez és a kapcsolt keveréket kompetens *E. coli* HB 101-sejtekbe transzfektáljuk. A transzformált tenyészeteket ampicillintartalmú táptalajt tartalmazó Petri-csészékbe öntjük és a rezisztens telepeket szelektáljuk. Ezekből a transzformánsokból a DNS-plazmidot elkészítjük és analizáljuk; az elemzés során a megfelelő inzert jelenlétét restriktációs enzimekkel vizsgáljuk és a szekvencia helyességének megerősítése céljából az 5' és 3' végződéseken az inzert kapcsolódásait szekvencia-analízissel határozzuk meg.

A plazmidok elnevezése: pSVAdsIFlpA, pSVAdsIFR2pA, pSVAdsIFR3pA, pSVAdsIFR4pA, pSVAdsIFR5pA. Ezeket a plazmidokat használjuk fel az oldható receptornak és fragmenseinek emlőssejtekben történő kifejezésére.

## 2. példa

*CHO-sejtekben történő kifejezés*

Miután az oldható receptor átmeneti kifejezését teszteltük, az oldható receptort folyamatosan kifejező stabil sejtvonalat felépítjük. Ennek elvégzéséhez gazdasajtként dihidro-folátreduktáz-deficiens vonalat alkalmazunk, és pedig a CHO DUK-X-vonalat használjuk [F. Kao és társai: PNAS USA, 64, 1284-1291 (1969); Chasin L. és Urlaub G.: Proc. Natl. Acad. Sci, 77, 4216-4280 (1980)]. E rendszer felhasználásával az oldható α- és β-interferon receptort az egér-DHFR-gént tartalmazó pSV2DHFR-vektorral ko-transzfektáljuk [Subrami és társai: Molec. Cell. Biol. 1, 854-864 (1981)]. E ko-transzfecció elvégzése előtt az összes plazmidot egy restriktációs enzimmel végzett restriktációval linearizáljuk, és transzfecció előtt minden plazmidot a pSV2DHFR-plazmiddal külön-külön összekeverünk oly módon, hogy az SV2DHFR-

és IFR-plazmid aránya 1 : 10 legyen. Ezáltal az IFR-gének kópiáinak egy transzfektánsra eső számát maximalizáljuk. A plazmidok a sejtben polimerek képződése mellett kapcsolódnak, amelyek a gazdasejt kromoszómájában rekombináció segítségével integrálhatók [Haynes és Weismann; Nucl. Acids. Res. 11, 687–706 (1983); Scallan S. J. és társai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4654–4658 (1983)]. A patkány- és egér-DHFR-t egy  $\alpha$ -táptalajban kifejező transzfektánsokat szelektáljuk; az  $\alpha$ -táptalaj nukleozidmentes közeg. Ezután a DHFR-t magas szinten kifejező sejtek szelektálása céljából methotrexátot adunk hozzá (MTX; a DHFR-hez kapcsolódó toxikus folát analóg). Az MTX-el szembeni rezisztencia a DHFR magas fokú kifejezésének következménye és gyakran a DHFR-gén amplifikációjának eredménye, amely hosszú kromoszóma-szegmenseket – úgynevezett „amplifikált egységeket” – tartalmazhat [Kaufman és Sharp: Molec. Cell. Biol. 1, 1069–1076 (1981)]. Ily módon a DHFR-szekvenciák és oldható  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptorok ko-integrációja az oldható  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptorok géneinek amplifikációját teszi lehetővé.

A stabilan transzfektált sejt vonalakat 10% magzati borjúsérummal kiegészített szelektív táptalajban [DMEM/HAM F12 1:1, Gibco] történő klónozással izoláljuk. Ezután a klónokat a legoldhatóbb  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptorokat kifejező klón megtalálása céljából oly módon screeneljük, hogy a kondicionált táptalajt  $^{35}\text{S}$ -ciszteinnel történő jelzés után in vivo immunokicsapásnak vetjük alá. Közelebbről, pSVAdIFR $\alpha$  vagy pSVAdIFR $\beta$  vagy pSVAdIFR2 $\alpha$  vagy pSVAdIFR3 $\alpha$  vagy pSVAd $\alpha$  vagy pSV2DHFR plazmiddal transzfektált körülbelül  $10^7$  CHO-sejtet 5 órán át 37 °C-on 4 ml RPMI cys-táptalajban (Gibco) 100 mCi/ml  $^{35}\text{S}$ -ciszteinnel (Amersham) inkubálunk. A sejtek jelzése után 1 ml szűrt kondicionált táptalajt 0,5 mM fenil-metil-szulfonil-fluoriddal beállítunk és a későbbiekben ismertetésre kerülő módon immunokicsapásnak vetjük alá. A csapadékot elektroforézissel redukív körülmények között 7,5%-os PAGE-gélen [U. K. Laemmli: Nature 227, 680–685 (1980)] frakcionáljuk.

### 3. példa

#### Az oldható $\alpha$ - és $\beta$ -interferon receptorok tisztítása

A pSVAdIFR3 $\alpha$ -szerkezetű, a rekombináns oldható  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptorokat kifejező CHO-sejtek klónját szelektáljuk és 1% magzati borjúsérummal (FCS), 1 g/l glükózzal és antibiotikumokkal [pl. sztreptomocinnal és penicillinnel (100 g/ml)] és 0,5 mM MTX-szel kiegészített DMEM/HAM F12 (1:1) táptalajban 4 üvegben (Becton és Dickinson) 8 napon át tenyésztjük. A felülúszót összegyűjtjük, 0,2  $\mu\text{m}$  maxi csészén (Gelman Sciences) átszűrjük és a kiválasztott fehérjét FPLC mono Q anioncserélő oszlopon (Pharmacia) betöményítjük. Az oszlopot 100 mM Hepes (pH 7), 10% glicerint, 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMFS) és 400 gátlási egység aprotinin kalli kreint/ml tartalmazó pufferrel öblítjük, majd nem folyamatos gradiens szerint nátrium-kloriddal (0,2 M-től 1,0 M-ig)

eluáljuk. Az oldható receptor az interferon megkötésére képes és ezután a receptor tisztaságának nyomonkövetésére a  $^{125}\text{I}$ -jódval jelzett interferon megkötését használjuk.

5 A receptort tartalmazó anyagot dializált mono Q oszlopon eluáljuk és Micro-Prodicon típusú készülékben betöményítjük. A 10 000 daltonnál nagyobb molekula-tömegű fehérjéket visszatartó membránt használunk. A betöményített anyagot 7,5% poliakril-amidot és 0,1% SDS-t tartalmazó 3 mm-es gélen csapjuk le. Egyidejűleg ugyanezen gél másik oldalán egy mintát (kb. 10  $\mu\text{g}$ ) lecsapunk. Elektroforézis után a gél ezen részét elektromos úton polividinil-bifluorid-membránra (Millipore) visszük át, majd  $^{125}\text{I}$ -jódval jelzett rekombináns humán  $\alpha$ -8-interferonnal hibridizáljuk. Ily módon az oldható receptor helyzetét elektroforézis után azonosíthatjuk. A gélnek az oldható receptort tartalmazó részét kivágjuk, molekuláris ultraszűrővel betöményítjük és az SDS eltávolítása céljából dializáljuk.

20

### 4. példa

#### Az $\alpha$ - és $\beta$ -interferonok oldható receptorai variánsainak kifejezésére szolgáló, humán kappa immunoglobulin konstans tartományához és humán $\gamma$ 1 immunoglobulin konstans tartományához fuzionált plazmidok felépítése

#### A könnyű lánc fúziói

Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferonok oldható receptorai kifejezésére szolgáló olyan plazmidokat építünk fel, amelyek a kapp immunoglobulin konstans tartományához fuzionált különböző hosszúságú extracelluláris tartományokat tartalmaznak. Ezen plazmidok elnevezése a továbbiakban: pSVAdIFR $\alpha$ IK, pSVAdIFR2K és pSVAdIFR3K.

35 A pSVAdIFR $\alpha$ IK-plazmid a metionin iniciációs kodonjától a lizin 436 kodon után levő fúziós pontig terjedő N-terminális részt tartalmaz, amelyet azonnal a kapp immunoglobulin konstans tartománya követ, amely a humán kapp immunoglobulin treonin 109 kodonjánál kezdődik [Kabat és társai: Hieter P. A. és társai: Cell 22, 197–207 (1980)].

50 Hasonlóképpen, a pSVAdIFR2K-plazmid a metionin iniciációs kodonjától a glutamát 427 kodon után levő fúziós pontig terjedő N-terminális részt tartalmaz, amelyet azonnal a kapp immunoglobulin konstans tartománya követ, amely a humán kapp immunoglobulin treonin 109 kodonjánál kezdődik [Kabat és társai; Hieter P. A. és társai: Cell 22, 197–207 (1980)].

Ezeket a plazmidokat a következőképpen építjük fel.

55 A kapp immunoglobulin DNS-fragmensét humán lép cDNS-könyvtárból szintetizáljuk (Clontech Laboratories, Inc.). A kívánt cDNS szintetizálása céljából a PCR-reakcióhoz primerként oligonukleotidokat alkalmazunk, amelyek a publikált DNS-szekvencia alapján az előre meghatározott tartományokkal komplementer szekvenciákat tartalmaznak [Hieter P. A. és társai: Cell 22, 197–207 (1980)]. Az oligonukleotid 5' végződésének szekvenciája a következő:

60 5'–ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCA–3'

míg a 3' végződés szekvenciája az alábbi:

3'-CCCTCTACAATCTCCCTCCATGGCCAG-5'

A PCR-reakciót az 1. példában leírt módon végezzük el azzal a változtatással, hogy templátként 1 µg plazmidot alkalmazunk, és a reakció után az elegyet a két szál végének helyreállítása céljából 4 trifoszfát-nukleozid jelenlétében Klenow-polimerázzal kezeljük.

5'-CCGGCTGCAGGGATCTGCGGCGGCTCCCAG-3'

míg az oligonukleotid 3' végződése az alábbi:

3'-CTCTTTTGTGTTTGGTCCTTTATGGAGATTT-5' oligo 1

3'-TCGTCACAAAATCAGCGACATACACTC-5' oligo 2

3'-CCACGAGGTTTGTGACACCTTTGTGCGGA-5' oligo 3

A PCR-reakciókat az 1. példában leírt módon végezzük el azzal a változtatással, hogy az utolsó reakcióciklus után a reakciótermékeket a két szál végének helyreállítása céljából Klenow-polimerázzal kezeljük, majd az IFR1-, IFR2- és IFR3-fragmensek kialakítása céljából PstI restrikciós enzimmel kezeljük.

A pSVAdAI kifejező vektort egymás után KpnI és PstI, majd foszfátáz segítségével emésztjük, és a plazmid legnagyobb részét tartalmazó P-fragmenst alacsony olvadáspontú agarózon végzett elektroforézissel izoláljuk.

Három komponenst tartalmazó reakcióban a P-fragmenst az immunoglobulin-fragmenshez és a sIFR1-fragmenshez kapcsoljuk. Hasonlóképpen a P-fragmenst az immunoglobulin-fragmenshez és az sIFR2-fragmenshez kapcsoljuk, és végül a P-fragmenst az immunoglobulin-fragmenshez és az sIFR3-fragmenshez kapcsoljuk.

Minden ligációs keveréket külön-külön kompetens *E. coli* HB101-baktériumba transzformálunk, a transzformált tenyészeteket ampicillintartalmú táptalajt tartalmazó Petri-csészékbe öntjük és az ampicillinrezisztens telepeket szelektáljuk. A plazmidokat a transzformánsokból izoláljuk és analizáljuk; az analízis során az inzert restrikciós enzimekkel határozzuk meg, vagy az inzert-összeillesztés DNS-szekvenciájának megerősítéséhez szekvencia-meghatározást végzünk. Az α- és β-interferonok oldható receptora fúziójának kifejezéséhez ezeket a plazmidokat alkalmazzuk.

#### A nehéz lánc fúziói

Az oldható α- és β-interferon receptorok kifejezésére szolgáló, a gl immunoglobulin konstans tartományához fuzionált különböző hosszúságú extracelluláris tartományokat tartalmazó plazmidokat építünk fel. Ezen plazmidokat a továbbiakban a következőképpen nevezzük: pSVAdsIFR1gl, pSVAdsIFR2gl és pSVAdsIFR3gl.

A pSVAdsIFR1gl-plazmid a metionin iniciációs kodonjától a lizin 436 kodonja után levő fúziós pontig terjedő N-terminális részt tartalmaz, amelyet azonnal a gl immunoglobulin konstans tartománya követ, amely a humán gl immunoglobulin alanin 113 kodonjánál kezdődik [Kabat és társai; Ellison J. W. és társai: Nucl. Acids Res. 10, 4071-4079 (1982)].

Hasonlóképpen a pSVAdsIFR2gl-plazmid a metionin iniciációs kodonjától a glutamát 427 kodonja

A DNS-t a KpnI restrikciós enzimmel emésztjük, és a kívánt fragmenst alacsony olvadáspontú agarózon végzett elektroforézissel izoláljuk.

5 Az oldható α- és β-interferon receptorok fragmen-seit kódoló DNS-fragmenseket azonos módon szintetizáljuk. Az 5' oligonukleotid 5' végződése az 1. példában leírttal azonos, azaz

után levő fúziós pontig terjedő N-terminális részt tartalmaz, amelyet azonnal a gl immunoglobulin konstans tartománya követ, amely a humán gl immunoglobulin alanin 113 kodonjánál kezdődik [Kabat és társai; Ellison J. W. és társai: Nucl. Acids Res. 10, 4071-4079 (1982)].

20 A pSVAdsIFR3gl-plazmid a metionin iniciációs kodonjától a prolin 360 kodonja után levő fúziós pontig terjedő N-terminális részt tartalmaz, amelyet azonnal a gl immunoglobulin konstans tartománya követ, amely a humán gl immunoglobulin alanin 113 kodonjánál kezdődik [Kabat és társai; Ellison J. W. és társai: Nucl. Acids Res. 10, 4071-4079 (1982)].

25 Ezeket a plazmidokat a következőképpen építjük fel:

30 A gl immunoglobulint kódoló szekvenciát humán lép cDNS-könyvtárból szintetizáljuk (Clontech Laboratories Inc.). A kívánt cDNS szintetizálása céljából a PCR-reakcióhoz primerként oligonukleotideket alkalmazunk, amelyek a publikált DNS-szekvencia alapján [Ellison és társai: Nucl. Acids Res. 10, 4071-4079 (1982)] előre meghatározott tartományokkal komplementer szekvenciát tartalmaznak.

Az oligonukleotid 5' végének szekvenciája a következő:

40 5'-GCCTCCACCAAGGGCCCCATCGGTCTTC CCC-3'

míg a 3' vég szekvenciája az alábbi:

3'-GACAGAGGCCCATTTACTCACCATGGC CAG-5'

45 A PCR-reakciót a továbbiakban ismertetésre kerülő módon végezzük el.

Az sIFR1-, sIFR2- és sIFR3-fragmens a fentiekben leírtakkal azonos és a kifejező vektorokat a korábbiakban, a könnyű lánc fúziója kapcsán leírtak szerint építjük fel.

#### 5. példa

Az oldható α- és β-interferon receptorok *E. coliban* történő kifejezésére szolgáló vektorok felépítése

55 Az sIFR *E. coliban* történő kifejezésére a pHR148 kifejező vektort alkalmazzuk. A pHR148-vektort Rink és társai írták le [Nucl. Acid. Res. 12, 6369-6387 (1984)]. A HR148-plazmidot egymás után NcoI restrikciós enzimekkel, majd a két szál végének

helyreállítása céljából 4 trifoszfát nukleozidok jelenlétében Klenow-polimerázzal és KpnI-lel emésztjük. A foszfátazzal végzett kezelés után a plazmid legnagyobb részét tartalmazó DNS-fragmenst (1. fragmens) alacsony olvadáspontú agarózon végzett elektroforézissel izoláljuk.

Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferonok érett oldható receptorát kódoló DNS-fragmenst (azaz amely nem tartalmaz peptid-szignált) PCR-reakcióval templátként a teljes cDNS-t tartalmazó plazmid [UZÉ és társai: Cell 60 (2), 225–234 (1990)] és primerként egy oligonukleotid-pár felhasználásával szintetizáljuk.

Az oligonukleotid 5' végének (az interferon N-terminális tartományából származtatható 1e) szekvenciája a következő:

5'–GGTGGAAAAATCTAAAATCTCCTCAA  
AAAG–3' (oligo 1)

míg az oligonukleotid 3' végének (az interferon transzmembrán régióját éppen megelőző tartományból származtatható 1e) szekvenciája az alábbi:

3'–TCACTGCGACATACACTCATCCCATGG  
CC–5' (oligo 2).

Az oligonukleotidokat oly módon választjuk meg, hogy PCR-fúzió után a szintetizált fragmens a 3' végződésen egy KpnI restrikciós enzim helyet és az 5' végződésen egy „tompá” véget tartalmazzon.

A PCR-reakciót az 1. példában leírtak szerint végezzük el azzal a változtatással, hogy a reakció után a termékeket a két szál végének helyreállítása céljából Klenow-polimerázzal, majd KpnI-enzimmal kezeljük. Az 1,3 kb fragmenst alacsony olvadáspontú agarózon végzett elektroforézissel izoláljuk és az 1. fragmenshez ligáljuk.

Egy második DNS-fragmenst hasonlóképpen szintetizálunk azzal a változtatással, hogy az 5' vég oligonukleotidot az

5'–GGAAAAAATCTAAAATCTCCTCAAAA  
AG–3' szekvenciával helyettesítjük.

A ligációs termékeket E. coli HB101-törzsbe transzformáljuk és a transzformált tenyészeteket ampicillintartalmú táptalajt tartalmazó Petri-csészébe öntjük. Az ampicillinrezisztens telepeket szelektáljuk, a plazmidokat a transzformánsokról izoláljuk és analizáljuk; az elemzés során restrikciós enzimekkel emésztjük és az inzert fúziós pontja szekvenciájának megerősítése céljából szekvenciameghatározást végzünk el.

Az oldható receptor E. coliban történő kifejezéséhez a ptrpIFR1 és ptrpIFR2 elnevezésű plazmidokat alkalmazzuk. A rekombináns fehérje kifejezése céljából a transzformánsokat 1,0 abszorpciós (A650) érték eléréséhez 20–50 ml tenyészőközegben M9 táptalajba [Rink és társai: Nucl. Acid. Res. 12, 6369–6387 (1984)] helyezzük. Ezután a sejteket centrifugáljuk, mossuk, az oldható interferon-receptort a feltört sejtekről extraháljuk és tisztítjuk. Az oldható  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptort Western blot vagy dot blot analízissel, a továbbiakban ismertetésre kerülő módon határozzuk meg.

## 6. példa

### Humán interferon oldható receptorának meghatározására szolgáló módszerek

Az oldható receptor meghatározásának módszerei a receptor azon képességén alapulnak, hogy humán  $\alpha$ -interferonhoz specifikus módon kötődni képes.

#### a) Immunokicsapás

A humán  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferonok oldható receptorának meghatározása azon alapul, hogy az oldható receptor és  $^{125}$ I-jóddal jelzett humán  $\alpha$ -8-interferon között komplex képződik, amely  $^{125}$ I-IFN-nek az  $\alpha$ -2-interferon terminális aminorésze ellen irányított monoklonális antitesthez történő kapcsolódását gátolja [H. Arnheiter és társai: Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80, 2539 (1983)]. Miután az interferon receptorához kötődött, a molekula terminális aminorésze az antitest számára nem hozzáférhető [H. Arnheiter és társai (1983)]. A szabadon maradó  $^{125}$ I-IFN-t az anti-IFN-antitesttel komplexbe visszük, majd A-sepharose fehérje (Pharmacia) hozzáadásával kicsapjuk. Az anti-IFN-antitestet az A-fehérjével a gyártó instrukciói szerint konjugáljuk.

A meghatározandó oldható receptorok 50  $\mu$ l borát-pufferrel (pH 8,3; 0,1 M  $H_3BO_3$ , 0,025 M  $Na_2B_4O_7$ , 0,075 M NaCl, 0,1% NP40) képezett sorozathígításait 81 Bq per fmol fajlagos aktivitású  $^{125}$ I-jóddal jelzett  $\alpha$ -2-interferon konstans mennyiségével (75 pmol) összekeverjük [K. E. Mogensen és G. Uze: Methods in Enzymol. 119C, 267 (1986)] és egy órán át 4 °C-on inkubáljuk. Konstans mennyiségű A-anti-IFN-fehérjét 50  $\mu$ l térfogatban felvesszük, amelyhez 50  $\mu$ l borát-puffert (pH 8,3; 0,2 M  $H_3BO_3$ , 0,05 M  $Na_2B_4O_7$ , 0,15 M NaCl, 0,1% NP40) adunk. Az elegyet egy órán át 4 °C-on keverjük, majd Eppendorf-féle mikrocentrifugában 10,000 g mellett egy percen át centrifugáljuk és a felülúszót elöntjük. A csapadékot borát-pufferrel (pH 8,3; 0,1 M  $H_3BO_3$ , 0,025 M  $Na_2B_4O_7$ , 1 M NaCl, 0,5% NP40) hatszor, 40 mM HEPES-sel (pH 8) és 2% glicerinrel kétszer, 40 mM HEPES-sel (pH 8) és 1 M karbamiddal egyszer, végül 40 mM HEPES-sel (pH 8) kétszer mossuk. A csapadékban levő immunkomplex radioaktivitásának megszámlálása – az interferon-anti-interferon komplexképződés gátlási görbéjével összehasonlítva – az ily módon tesztelt minta oldható  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptor tartalmának meghatározását teszi lehetővé.

#### b) Humán $\alpha$ - és $\beta$ -interferonok oldható receptorának meghatározása a jelzett interferon sejtreceptorához történő kötődésének gátlása útján

Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferonok oldható receptorainak sorozathígításait 30 percen át 4 °C-on  $^{125}$ I-jóddal (fajlagos radioaktivitás 25 Bq per fmol) jelzett rekombináns humán  $\alpha$ -8-interferon változó koncentrációjú mennyiségeivel (0, 50, 100, 125, 500, 1000 és 2000 NE /ml) inkubáljuk. Ezután különböző  $^{125}$ I-IFN oldható receptor-keverékekhez  $10^7$  sejt/ml végső koncentrációban Daudi humán limfoidsejteket adunk, és 2 órán át 4 °C-on inkubáljuk. A sejteket centrifugáljuk (800 g mellett, 10 percen át), majd a felülúszót elöntjük. Ezután 0,5% magzati borjúsérumot (Flow Laboratories) tartalmazó RPMI 1640 táptalajjal háromszor mossuk és a sejtekhez

kötött radioaktivitást LKB 1270 típusú gamma-számlálóval történő számlálással meghatározzuk.

Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferonok oldható receptorának mennyiségét az interferon sejtreceptorához történő specifikus kötődésének gátlási görbéjéből határozzuk meg. A fajlagos megkötés a  $^{125}\text{I}$ -IFN önmagában és 100-szoros nem jelzett interferon-fölösleg jelenlétében felvett megkötési görbéi közötti különbség.

c)  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferonok oldható receptorának meghatározása „Western blot” módszerrel

Az  $\alpha$ -interferon receptor jelenlétére vizsgálandó mintát a 30,000 daltonnál nagyobb molekulatömegű fehérjét visszatarató Amicon Centricon 30 típusú membrán felhasználásával betöményítjük. A mintákat 60 mM trisz-HCl-pufferben (pH 6,8; 1,25% SDS, 1 mM PMFS és 400 gátlási egység kallikrein/ml aprotinin/ felvesszük, és 0,1% SDS-t tartalmazó 7,5% poliakrilamid gélen lecsapjuk. Standard körülmények között végzett elektroforézis után a mintákat „félzsilárd” típusú elektrotranszfer-készülékben (Nova Blot) 200 mA mellett egy óra alatt 39 mM glicint, 48 mM trisz-bázist (pH 8,3) és 18% metanolt tartalmazó pufferben polivinidil-bifluorid-membránra (Millipora) visszük át. Az átvitel után a membránt 20 mM trisz-bázist, 0,2% Tween 20-t (pH 7,8) és 10% lefőlt tejet tartalmazó pufferrel (Regilait, Franciaország) keverés közben 25 °C-on 4 órán át keverjük. Ezután  $10^{-10}$  M  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -8-interferonnal (fajlagos aktivitás 50 Bq per femtomól) 2 órán át 25 °C-on keverés közben a fenti pufferben hibridizáljuk. A membránt ugyanezen puffer aliquot részeivel ötször mossuk, majd levegőn szárítjuk és röntgensugárzásra érzékeny filmnek tesszük ki.

A rekombináns humán  $\alpha$ -8-( $\alpha$ -8)-interferont  $^{125}\text{J}$ ódal jelezzük, a korábbiakban leírt klóramin-módszer [K. E. Mogensen és G. Uze: Methods in Enzym. 119C, 267 (1986)] módosításával. Ez 25 Bq per fmol vagy 6 Bq per nemzetközi interferonegység fajlagos radioaktivitásnak felel meg.

d) Humán  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferonok oldható receptorának meghatározása „dot blot” módszerrel

A meghatározandó oldható receptorok preparátumainak sorozathígításait 50  $\mu\text{l}$ , 39 mM glicint és 48 mM trisz-bázist (pH 8,3) tartalmazó pufferben végezzük el és polivinidil-bifluorid-membránnal (Millipore) töltött „Bio-Blot” típusú készülék (Biorad) mélyedéseiben ülepedni hagyjuk.

A membránt 4 órán át 25 °C-on keverés közben 20 mM trisz-bázist, 0,2% Tween 20-t (pH 7,8) és 10% főlözött tejet tartalmazó pufferrel (Regilait, Franciaország) kezeljük. Ezután ugyanebben a pufferben  $^{125}\text{I}$ -IFN  $\alpha$ -8-cal  $10^{-10}$  M (fajlagos aktivitás 25 Bq per fmol) mellett 25 °C-on 2 órán át keverés közben hibridizáljuk, majd keverés közben a fenti puffer aliquot részével ötször mossuk és röntgensugárzásra érzékeny filmnek tesszük ki. Az autoradiograf analízise és standard görbével történő összehasonlítás segítségével a membránhoz kötődő  $^{125}\text{I}$ -IFN mennyisége meghatározható és ebből a vizsgált mintában az oldható receptor koncentrációja megállapítható.

A rekombináns humán  $\alpha$ -8-( $\alpha$ -8)-interferon  $^{125}\text{J}$ ódal történő jelzését a klóramin T-módszer [K. E. Mogensen és G. Uze: Methods in Enzymol. 119C, 267 (1986)] módosításával végezzük el. Ez 25 Bq per fmol vagy 6 Bq per nemzetközi interferonegység fajlagos radioaktivitásnak felel meg.

#### 7. példa

##### Gyógyászati készítmény

|                                                    |                                                        |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 10                                                 | Alábbi összetételű injekciós készítményt állítunk elő: |
|                                                    | <i>Komponens</i> <i>Mennyiség</i>                      |
| 3. példa szerinti termék                           | 100 mg                                                 |
| Injekciós készítményekben felhasználható excipiens | 2 ml                                                   |

### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

#### 1. Eljárás vízdítható polipeptidek, éspedig

20 a) az 1. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciájú polipeptid és annak delécióval és/vagy helyettesítéssel kialakított származékai,  
b) az 1. ábrán bemutatott nukleinsav-szekvencia által kódolt polipeptidek, és

25 c) a 2. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciájú polipeptid-delécióval és/vagy helyettesítéssel kialakított származékai előállítására önmagukban vagy egy második polipeptiddel képezett hibridek formájában, *azzal jellemezve*, hogy az adott polipeptidet vagy hibridet kifejezni képes sejteket alkalmas közegen tenyésztjük, majd a kifejezett terméket elkülönítjük.

30 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás az 1. igénypontban meghatározott valamely vízdítható polipeptid előállítására olyan plazmafehérjével mint második polipeptiddel képezett hibrid formájában, amelynek plazmában való felezési ideje nagyobb az első polipeptidénél, *azzal jellemezve*, hogy az adott hibridet kifejezni képes sejteket alkalmas közegen tenyésztjük, majd a kifejezett terméket elkülönítjük.

35 3. A 2. igénypont szerinti eljárás második polipeptidként egy immunoglobulinnal képezett hibridek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az adott hibridet kifejezni képes sejteket alkalmas közegen tenyésztjük, majd a kifejezett terméket elkülönítjük.

45 4. A 3. igénypont szerinti eljárás második polipeptidként egy G típusú, előnyösen G1 típusú immunoglobulinnal képezett hibridek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az adott hibridet kifejezni képes sejteket alkalmas közegen tenyésztjük, majd a kifejezett terméket elkülönítjük.

50 5. Eljárás az 1–4. igénypontok bármelyikében meghatározott polipeptidek és hibridek kódolására alkalmas DNS-szekvenciák előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő DNS-fragmenseket és/vagy nukleinsavakat ismert géntechnológiai módszerekkel a helyes sorrendben összekapcsoljuk, majd a kapott terméket polimeráz láncreakcióval (PCR) sokszorozzuk.

60 6. Eljárás az 1–4. igénypontok bármelyikében meghatározott polipeptidek és hibridek termelésére alkalmas sejt előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy sejtet

egy, az 5. igénypontban meghatározott DNS-szekvenciával transzfektálunk.

7. Eljárás gyógyászati készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, az 1–4. igénypontok bármelyike szerint előállított polipeptidet vagy hibridet gyógyászati lag alkalmazható hordozó-, hígító- és/vagy más segédanyagok felhasználásával, ismert gyógyszer technológiai műveletekkel gyógyászati készítménnyé alakítunk.

8. Eljárás interferon receptor elleni antitestek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy melegvérű állatoknak az 1–4. igénypontok bármelyike szerint előállított polipeptidet vagy hibridet és gyógyászati lag alkalmazha-

tó szubsztrátumot adunk be, majd az immunreakció lezajlása után az állatot kivérezzük, és a vérből elkülönítjük az antitesteket.

9. Eljárás  $\alpha$ - és  $\beta$ -interferon receptor elleni antitestek jelenlétének kimutatására biológiai mintákban, amelynek során a biológiai mintát az antitesttel immunológiai komplexet képező anyaggal hozzuk érintkezésbe a komplex kialakulását lehetővé tevő körülmények között, majd a képződött immunológiai komplexet kimutatjuk, *azzal jellemezve*, hogy komplexképzőként az 1–4. igénypontok bármelyike szerint előállított polipeptidet vagy hibridet használjuk.

## 1. ábra

CTGCAGGGATCTGCGGCGGCTCCCAG

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ATG | ATG | GTC | GTC | CTC | CTG | GGC | GCG | ACG | ACC | CTA | GTG | CTC | GTC |
| MET | MET | Val | Val | Leu | Leu | Gly | Ala | Thr | Thr | Leu | Val | Leu | Val |
| GCC | GTG | GGC | CCA | TGG | GTG | TTG | TCC | GCA | GCC | GCA | GGT | GGA | AAA |
| Ala | Val | Gly | Pro | Trp | Val | Leu | Ser | Ala | Ala | Ala | Gly | Gly | Lys |
| AAT | CTA | AAA | TCT | CCT | CAA | AAA | GTA | GAG | GTC | GAC | ATC | ATA | GAT |
| Asn | Leu | Lys | Ser | Pro | Gln | Lys | Val | Glu | Val | Asp | Ile | Ile | Asp |
| GAC | AAC | TTT | ATC | CTG | AGG | TGG | AAC | AGG | AGC | GAT | GAG | TCT | GTC |
| Asp | Asn | Phe | Ile | Leu | Arg | Trp | Asn | Arg | Ser | Asp | Glu | Ser | Val |
| GGG | AAT | GTG | ACT | TTT | TCA | TTC | GAT | TAT | CAA | AAA | ACT | GGG | ATG |
| Gly | Asn | Val | Thr | Phe | Ser | Phe | Asp | Tyr | Gln | Lys | Thr | Gly | MET |
| GAT | AAT | TGG | ATA | AAA | TTG | TCT | GGG | TGT | CAG | AAT | ATT | ACT | AGT |
| Asp | Asn | Trp | Ile | Lys | Leu | Ser | Gly | Cys | Gln | Asn | Ile | Thr | Ser |
| ACC | AAA | TGC | AAC | TTT | TCT | TCA | CTC | AAG | CTG | AAT | GTT | TAT | GAA |
| Thr | Lys | Cys | Asn | Phe | Ser | Ser | Leu | Lys | Leu | Asn | Val | Tyr | Glu |
| GAA | ATT | AAA | TTG | CGT | ATA | AGA | GCA | GAA | AAA | GAA | AAC | ACT | TCT |
| Glu | Ile | Lys | Leu | Arg | Ile | Arg | Ala | Glu | Lys | Glu | Asn | Thr | Ser |
| TCA | TGG | TAT | GAG | GTT | GAC | TCA | TTT | ACA | CCA | TTT | CGC | AAA | GCT |
| Ser | Trp | Tyr | Glu | Val | Asp | Ser | Phe | Thr | Pro | Phe | Arg | Lys | Ala |
| CAG | ATT | GGT | CCT | CCA | GAA | GTA | CAT | TTA | GAA | GCT | GAA | GAT | AAG |
| Gln | Ile | Gly | Pro | Pro | Glu | Val | His | Leu | Glu | Ala | Glu | Asp | Lys |
| GCA | ATA | GTG | ATA | CAC | ATC | TCT | CCT | GGA | ACA | AAA | GAT | AGT | GTT |
| Ala | Ile | Val | Ile | His | Ile | Ser | Pro | Gly | Thr | Lys | Asp | Ser | Val |
| ATG | TGG | GCT | TTG | GAT | GGT | TTA | AGC | TTT | ACA | TAT | AGC | TTA | CTT |
| MET | Trp | Ala | Leu | Asp | Gly | Leu | Ser | Phe | Thr | Tyr | Ser | Leu | Leu |
| ATC | TGG | AAA | AAC | TCT | TCA | GGT | GTA | GAA | GAA | AGG | ATT | GAA | AAT |
| Ile | Trp | Lys | Asn | Ser | Ser | Gly | Val | Glu | Glu | Arg | Ile | Glu | Asn |
| ATT | TAT | TCC | AGA | CAT | AAA | ATT | TAT | AAA | CTC | TCA | CCA | GAG | ACT |
| Ile | Tyr | Ser | Arg | His | Lys | Ile | Tyr | Lys | Leu | Ser | Pro | Glu | Thr |
| ACT | TAT | TGT | CTA | AAA | GTT | AAA | GCA | GCA | CTA | CTT | ACG | TCA | TGG |
| Thr | Tyr | Cys | Leu | Lys | Val | Lys | Ala | Ala | Leu | Leu | Thr | Ser | Trp |

## 1. ábra folytatása

|     |     |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AAA | ATT | GGT       | GTC | TAT | AGT | CCA | GTA | CAT | TGT | ATA | AAG | ACC | ACA |
| Lys | Ile | Gly       | Val | Tyr | Ser | Pro | Val | His | Cys | Ile | Lys | Thr | Thr |
| GTT | GAA | AAT       | GAA | CTA | CCT | CCA | CCA | GAA | AAT | ATA | GAA | GTC | AGT |
| Val | Glu | Asn       | Glu | Leu | Pro | Pro | Pro | Glu | Asn | Ile | Glu | Val | Ser |
| GTC | CAA | AAT       | CAG | AAC | TAT | GTT | CTT | AAA | TGG | GAT | TAT | ACA | TAT |
| Val | Gln | Asn       | Gln | Asn | Tyr | Val | Leu | Lys | Trp | Asp | Tyr | Thr | Tyr |
| GCA | AAC | ATG       | ACC | TTT | CAA | GTT | CAG | TGG | CTC | CAC | GCC | TTT | TTA |
| Ala | Asn | MET       | Thr | Phe | Gln | Val | Gln | Trp | Leu | His | Ala | Phe | Leu |
| AAA | AGG | AAT       | CCT | GGA | AAC | CAT | TTG | TAT | AAA | TGG | AAA | CAA | ATA |
| Lys | Arg | Asn       | Pro | Gly | Asn | His | Leu | Tyr | Lys | Trp | Lys | Gln | Ile |
| CCT | GAC | TGT       | GAA | AAT | GTC | AAA | ACT | ACC | CAG | TGT | GTC | TTT | CCT |
| Pro | Asp | Cys       | Glu | Asn | Val | Lys | Thr | Thr | Gln | Cys | Val | Phe | Pro |
| CAA | AAC | GTT       | TTC | CAA | AAA | GGA | ATT | TAC | CTT | CTC | CGC | GTA | CAA |
| Gln | Asn | Val       | Phe | Gln | Lys | Gly | Ile | Tyr | Leu | Leu | Arg | Val | Gln |
| GCA | TCT | GAT       | GGA | AAT | AAC | ACA | TCT | TTT | TGG | TCT | GAA | GAG | ATA |
| Ala | Ser | Asp       | Gly | Asn | Asn | Thr | Ser | Phe | Trp | Ser | Glu | Glu | Ile |
| AAG | TTT | GAT       | ACT | GAA | ATA | CAA | GCT | TTC | CTA | CTT | CCT | CCA | GTC |
| Lys | Phe | Asp       | Thr | Glu | Ile | Gln | Ala | Phe | Leu | Leu | Pro | Pro | Val |
| TTT | AAC | ATT       | AGA | TCC | CTT | AGT | GAT | TCA | TTC | CAT | ATC | TAT | ATC |
| Phe | Asn | Ile       | Arg | Ser | Leu | Ser | Asp | Ser | Phe | His | Ile | Tyr | Ile |
| GGT | GCT | CCA       | AAA | CAG | TCT | GGA | AAC | ACG | CCT | GTG | ATC | CAG | GAT |
| Gly | Ala | Pro       | Lys | Gln | Ser | Gly | Asn | Thr | Pro | Val | Ile | Gln | Asp |
| TAT | CCA | CTG       | ATT | TAT | GAA | ATT | ATT | TTT | TGG | GAA | AAC | ACT | TCA |
| Tyr | Pro | Leu       | Ile | Tyr | Glu | Ile | Ile | Phe | Trp | Glu | Asn | Thr | Ser |
| AAT | GCT | GAG       | AGA | AAA | ATT | ATC | GAG | AAA | AAA | ACT | GAT | GTT | ACA |
| Asn | Ala | Glu       | Arg | Lys | Ile | Ile | Glu | Lys | Lys | Thr | Asp | Val | Thr |
| GTT | CCT | AAT       | TTG | AAA | CCA | CTG | ACT | GTA | TAT | TGT | GTG | AAA | GCC |
| Val | Pro | Asn       | Leu | Lys | Pro | Leu | Thr | Val | Tyr | Cys | Val | Lys | Ala |
| AGA | GCA | CAC       | ACC | ATG | GAT | GAA | AAG | CTG | AAT | AAA | AGC | AGT | GTT |
| Arg | Ala | His       | Thr | MET | Asp | Glu | Lys | Leu | Asn | Lys | Ser | Ser | Val |
| TTT | AGT | GAC       | GCT | GTA | TGT | GAG | AAA | ACA | AAA | CCA | GGA | AAT | ACC |
| Phe | Ser | Asp       | Ala | Val | Cys | Glu | Lys | Thr | Lys | Pro | Gly | Asn | Thr |
| TCT | AAA | TGAGGTACC |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Lys |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

## 2. ábra

CTGCAGGGATCTGCGGCGGCTCCCAG

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ATG | ATG | GTC | GTC | CTC | CTG | GGC | GCG | ACG | ACC | CTA | GTG | CTC | GTC |
| MET | MET | Val | Val | Leu | Leu | Gly | Ala | Thr | Thr | Leu | Val | Leu | Val |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| GCC | GTG | GGC | CCA | TGG | GTG | TTG | TCC | GCA | GCC | GCA | GGT | GGA | AAA |
| Ala | Val | Gly | Pro | Trp | Val | Leu | Ser | Ala | Ala | Ala | Gly | Gly | Lys |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| AAT | CTA | AAA | TCT | CCT | CAA | AAA | GTA | GAG | GTC | GAC | ATC | ATA | GAT |
| Asn | Leu | Lys | Ser | Pro | Gln | Lys | Val | Glu | Val | Asp | Ile | Ile | Asp |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| GAC | AAC | TTT | ATC | CTG | AGG | TGG | AAC | AGG | AGC | GAT | GAG | TCT | GTC |
| Asp | Asn | Phe | Ile | Leu | Arg | Trp | Asn | Arg | Ser | Asp | Glu | Ser | Val |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| GGG | AAT | GTG | ACT | TTT | TCA | TTC | GAT | TAT | CAA | AAA | ACT | GGG | ATG |
| Gly | Asn | Val | Thr | Phe | Ser | Phe | Asp | Tyr | Gln | Lys | Thr | Gly | MET |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| GAT | AAT | TGG | ATA | AAA | TTG | TCT | GGG | TGT | CAG | AAT | ATT | ACT | AGT |
| Asp | Asn | Trp | Ile | Lys | Leu | Ser | Gly | Cys | Gln | Asn | Ile | Thr | Ser |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ACC | AAA | TGC | AAC | TTT | TCT | TCA | CTC | AAG | CTG | AAT | GTT | TAT | GAA |
| Thr | Lys | Cys | Asn | Phe | Ser | Ser | Leu | Lys | Leu | Asn | Val | Tyr | Glu |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| GAA | ATT | AAA | TTG | CGT | ATA | AGA | GCA | GAA | AAA | GAA | AAC | ACT | TCT |
| Glu | Ile | Lys | Leu | Arg | Ile | Arg | Ala | Glu | Lys | Glu | Asn | Thr | Ser |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| TCA | TGG | TAT | GAG | GTT | GAC | TCA | TTT | ACA | CCA | TTT | CGC | AAA | GCT |
| Ser | Trp | Tyr | Glu | Val | Asp | Ser | Phe | Thr | Pro | Phe | Arg | Lys | Ala |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| CAG | ATT | GGT | CCT | CCA | GAA | GTA | CAT | TTA | GAA | GCT | GAA | GAT | AAG |
| Gln | Ile | Gly | Pro | Pro | Glu | Val | His | Leu | Glu | Ala | Glu | Asp | Lys |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| GCA | ATA | GTG | ATA | CAC | ATC | TCT | CCT | GGA | ACA | AAA | GAT | AGT | GTT |
| Ala | Ile | Val | Ile | His | Ile | Ser | Pro | Gly | Thr | Lys | Asp | Ser | Val |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ATG | TGG | GCT | TTG | GAT | GGT | TTA | AGC | TTT | ACA | TAT | AGC | TTA | CTT |
| MET | Trp | Ala | Leu | Asp | Gly | Leu | Ser | Phe | Thr | Tyr | Ser | Leu | Leu |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ATC | TGG | AAA | AAC | TCT | TCA | GGT | GTA | GAA | GAA | AGG | ATT | GAA | AAT |
| Ile | Trp | Lys | Asn | Ser | Ser | Gly | Val | Glu | Glu | Arg | Ile | Glu | Asn |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ATT | TAT | TCC | AGA | CAT | AAA | ATT | TAT | AAA | CTC | TCA | CCA | GAG | ACT |
| Ile | Tyr | Ser | Arg | His | Lys | Ile | Tyr | Lys | Leu | Ser | Pro | Glu | Thr |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ACT | TAT | TGT | CTA | AAA | GTT | AAA | GCA | GCA | CTA | CTT | ACG | TCA | TGG |
| Thr | Tyr | Cys | Leu | Lys | Val | Lys | Ala | Ala | Leu | Leu | Thr | Ser | Trp |

## 2. ábra folytatása

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AAA | ATT | GGT | GTC | TAT | AGT | CCA | GTA | CAT | TGT | ATA | AAG | ACC | ACA |
| Lys | Ile | Gly | Val | Tyr | Ser | Pro | Val | His | Cys | Ile | Lys | Thr | Thr |
| GTT | GAA | AAT | GAA | CTA | CCT | CCA | CCA | GAA | AAT | ATA | GAA | GTC | AGT |
| Val | Glu | Asn | Glu | Leu | Pro | Pro | Pro | Glu | Asn | Ile | Glu | Val | Ser |
| GTC | CAA | AAT | CAG | AAC | TAT | GTT | CTT | AAA | TGG | GAT | TAT | ACA | TAT |
| Val | Gln | Asn | Gln | Asn | Tyr | Val | Leu | Lys | Trp | Asp | Tyr | Thr | Tyr |
| GCA | AAC | ATG | ACC | TTT | CAA | GTT | CAG | TGG | CTC | CAC | GCC | TTT | TTA |
| Ala | Asn | MET | Thr | Phe | Gln | Val | Gln | Trp | Leu | His | Ala | Phe | Leu |
| AAA | AGG | AAT | CCT | GGA | AAC | CAT | TTG | TAT | AAA | TGG | AAA | CAA | ATA |
| Lys | Arg | Asn | Pro | Gly | Asn | His | Leu | Tyr | Lys | Trp | Lys | Gln | Ile |
| CCT | GAC | TGT | GAA | AAT | GTC | AAA | ACT | ACC | CAG | TGT | GTC | TTT | CCT |
| Pro | Asp | Cys | Glu | Asn | Val | Lys | Thr | Thr | Gln | Cys | Val | Phe | Pro |
| CAA | AAC | GTT | TTC | CAA | AAA | GGA | ATT | TAC | CTT | CTC | CGC | GTA | CAA |
| Gln | Asn | Val | Phe | Gln | Lys | Gly | Ile | Tyr | Leu | Leu | Arg | Val | Gln |
| GCA | TCT | GAT | GGA | AAT | AAC | ACA | TCT | TTT | TGG | TCT | GAA | GAG | ATA |
| Ala | Ser | Asp | Gly | Asn | Asn | Thr | Ser | Phe | Trp | Ser | Glu | Glu | Ile |
| AAG | TTT | GAT | ACT | GAA | ATA | CAA | GCT | TTC | CTA | CTT | CCT | CCA | GTC |
| Lys | Phe | Asp | Thr | Glu | Ile | Gln | Ala | Phe | Leu | Leu | Pro | Pro | Val |
| TTT | AAC | ATT | AGA | TCC | CTT | AGT | GAT | TCA | TTC | CAT | ATC | TAT | ATC |
| Phe | Asn | Ile | Arg | Ser | Leu | Ser | Asp | Ser | Phe | His | Ile | Tyr | Ile |
| GGT | GCT | CCA | AAA | CAG | TCT | GGA | AAC | ACG | CCT | GTG | ATC | CAG | GAT |
| Gly | Ala | Pro | Lys | Gln | Ser | Gly | Asn | Thr | Pro | Val | Ile | Gln | Asp |
| TAT | CCA | CTG | ATT | TAT | GAA | ATT | ATT | TTT | TGG | GAA | AAC | ACT | TCA |
| Tyr | Pro | Leu | Ile | Tyr | Glu | Ile | Ile | Phe | Trp | Glu | Asn | Thr | Ser |
| AAT | GCT | GAG | AGA | AAA | ATT | ATC | GAG | AAA | AAA | ACT | GAT | GTT | ACA |
| Asn | Ala | Glu | Arg | Lys | Ile | Ile | Glu | Lys | Lys | Thr | Asp | Val | Thr |
| GTT | CCT | AAT | TTG | AAA | CCA | CTG | ACT | GTA | TAT | TGT | GTG | AAA | GCC |
| Val | Pro | Asn | Leu | Lys | Pro | Leu | Thr | Val | Tyr | Cys | Val | Lys | Ala |
| AGA | GCA | CAC | ACC | ATG | GAT | GAA | AAG | CTG | AAT | AAA | AGC | AGT | GTT |
| Arg | Ala | His | Thr | MET | Asp | Glu | Lys | Leu | Asn | Lys | Ser | Ser | Val |
| TTT | AGT | GAC | GCT | GTA | TGT | GAG | AAA | ACA | AAA | CCA | GGA | AAT | ACC |
| Phe | Ser | Asp | Ala | Val | Cys | Glu | Lys | Thr | Lys | Pro | Gly | Asn | Thr |
| TCT | AAA | ATT | TGG | CTT | ATA | GTT | GGA | ATT | TGT | ATT | GCA | TTA | TTT |
| Ser | Lys | Ile | Trp | Leu | Ile | Val | Gly | Ile | Cys | Ile | Ala | Leu | Phe |

## 2. ábra folytatása

|                                                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GCT                                                     | CTC | CCG | TTT | GTC | ATT | TAT | GCT | GCG | AAA | CTC | TTC | TTG | AGA |
| Ala                                                     | Leu | Pro | Phe | Val | Ile | Tyr | Ala | Ala | Lys | Val | Phe | Leu | Arg |
| TGC                                                     | ATC | AAT | TAT | GTC | TTC | TTT | CCA | TCA | CTT | AAA | CCT | TCT | TCC |
| Cys                                                     | Ile | Asn | Tyr | Val | Phe | Phe | Pro | Ser | Leu | Lys | Pro | Ser | Ser |
| AGT                                                     | ATA | GAT | GAG | TAT | TTC | TCT | GAA | CAG | CCA | TTG | AAG | AAT | CTT |
| Ser                                                     | Ile | Asp | Glu | Tyr | Phe | Ser | Glu | Gln | Pro | Leu | Lys | Asn | Leu |
| CTG                                                     | CTT | TCA | ACT | TCT | GAG | GAA | CAA | ATC | GAA | AAA | TGT | TTC | ATA |
| Leu                                                     | Leu | Ser | Thr | Ser | Glu | Glu | Gln | Ile | Glu | Lys | Cys | Phe | Ile |
| ATT                                                     | GAA | AAT | ATA | AGC | ACA | ATT | GCT | ACA | GTA | GAA | GAA | ACT | AAT |
| Ile                                                     | Glu | Asn | Ile | Ser | Thr | Ile | Ala | Thr | Val | Glu | Glu | Thr | Asn |
| CAA                                                     | ACT | GAT | GAA | GAT | CAT | AAA | AAA | TAC | AGT | TCC | CAA | ACT | AGC |
| Gln                                                     | Thr | Asp | Glu | Asp | His | Lys | Lys | Tyr | Ser | Ser | Gln | Thr | Ser |
| CAA                                                     | GAT | TCA | GGA | AAT | TAT | TCT | AAT | GAA | GAT | GAA | AGC | GAA | AGT |
| Gln                                                     | Asp | Ser | Gly | Asn | Tyr | Ser | Asn | Glu | Asp | Glu | Ser | Glu | Ser |
| AAA                                                     | ACA | AGT | GAA | GAA | CTA | CAG | CAG | GAC | TTT | GTA | TGA |     |     |
| Lys                                                     | Thr | Ser | Glu | Glu | Leu | Gln | Gln | Asp | Phe | Val |     |     |     |
| CCAGAAATGAACTGTGTCAAGTATAAGGTTTTTCAGCAGGAGTTACACTGGTACC |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |