

Vakcinakészítmények

Kivonat

5

A találmány tárgyát készítmények és eljárások képezik rákos betegség, úgymint vastagbélrák, vastag- és végbélrák, emlőrák, húgyhólyagrák, tüdőrák és endometriumrák kezelésére és diagnosztizálására. Közelebbről, a találmány tárgyát cripto-tüdőtumorprotein legalább egy részletét tartalmazó polipeptidek képezik. A találmány tárgyához tartoznak továbbá a találmány szerinti polipeptideket kódoló polinukleotidok, továbbá olyan gyógyászati készítmények, pl. vakcinák és egyéb készítmények, amelyek hasznosak a cripto-protein termelésével jellemezhető carcinomák (pl. bizonyos nem kis sejtes tüdőcarcinomák, emlőrák, vastagbélrák, vastag- és végbélrák) kezelésére.

15

Jelentő a brz 0

Zoltán Ádám

Vakcinakészítmények

A találmány tárgyát készítmények és eljárások képezik rákos betegség, úgymint vastagbélrák, vastag- és végbélrák, emlőrák, húgyhólyagrák, tüdőrák és endometriumrák kezelésére és diagnosztizálására. Közelebbről, a találmány tárgyát cripto-tüdőtumorprotein legalább egy részletét tartalmazó polipeptidek képezik. A találmány tárgyhöz tartoznak továbbá a találmány szerinti polipeptideket kódoló polinukleotidok, továbbá olyan gyógyászati készítmények, pl. vakcinák és egyéb készítmények, amelyek hasznosak a cripto-protein termelésével jellemezhető carcinomák (pl. bizonyos nem kis sejtes tüdőcarcinomák, emlőrák, vastagbélrák, vastag- és végbélrák) kezelésére.

A találmány szerinti polipeptidek és polinukleotidok előnyösen alkalmazhatók gyógyászati készítmények, például, vakcinák és egyéb, bizonyos rákbetegségek diagnosztizálására és kezelésére szolgáló készítmények komponenseiként.

A CRIPTO-protein egy 188 aminosavas fehérje, amely homológ az epidermális növekedési faktor (EGF) családdal [EMBO Journal 8(7), 1987 (1989)].

A huCRIPTO-mRNS-t csak differenciálatlan sejtekben detektálható; a sejt differenciációt követően eltűnik. Az mCRIPTO-protein a vemhesség és a szoptatás során termelődik (az emlő-epithelsejtek elágazási morfogenezisét indukálva), és feltételezhetően a normál emlősejtek autokrin növekedési faktoraként funkcionál. A CRIPTO-protein egérembriókban az anterior-posterior tengely pontos orientációjáért felelős.

A humán cripto-gént az 5 654 140 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban tárták fel.

A rák világszerte súlyos egészségügyi probléma. Bár a rák kimutatásában és kezelésében jelentős előrehaladások tapasztalhatók, jelenleg nem áll rendelkezésre rák megelőzésére és/vagy gyógykezelésére univerzálisan sikerrel alkalmazható vakcina vagy egyéb eljárás. A jelenleg ismert gyógykezelési eljárások, melyek általában kemoterápia, sebészeti beavatkozás és sugárkezelés kombinációján alapulnak, számos beteg esetében alkalmatlannak bizonyulnak.

A vastagbélrák az Egyesült Államokban a második leggyakrabban diagnosztizált malignáns betegség, s egyben a második leggyakoribb halálok. 1998-ra 95 600 új vastagbélrákos esetet és 47 700 vastagbélrákból eredő elhalálozást prognosztizáltak. A korai, lokalizált stádiumban felismert vastagbélrákban szenvedő páciensek ötéves túlélési rátája 92 %, azonban a vastagbélrákos esetek mindössze 37 %-át diagnosztizálják ebben a korai stádiumban. Ha a

vastagbél tumor a szomszédos szervekre vagy nyirokcsomókra is áttérjedt, az ötéves túlélési ráta 64 %-ra csökken, míg távoli metasztázisok jelenléte esetén a túlélési ráta már csak 7 %.

A vastagbélrák prognózisa közvetlen összefüggésben áll a tumor belfalon történő áthatolásának mértékével, a metasztatizálódás fokával, a nyirokcsomók érintettségének meglétével vagy hiányával, következésképpen, a korai detektálás és kezelés különösen fontos. Jelenleg a diagnosztizálást véres széklet szűrése, szigmoidoszkópia, kolonoszkópia és kettős kontraszt bárium beöntés segítségével végzik. Az adott esetekben alkalmazandó kezelési módszer a rák típusa és stádiuma alapján határozható meg. A kezelés sebészeti beavatkozással, sugárterápiával és/vagy kemoterápiával történhet. A leggyakoribb terápiás módszernek tekinthető sebészeti beavatkozás utáni kiújulás az egyik legfőbb problémát jelenti (és gyakran ez a végső halálok). A rák hatékony gyógykezelésére irányuló kutatások ellenére a vastagbélrák továbbra is nehezen diagnosztizálható és kezelhető, így igen nagy szükség van az ilyen rákbetegségek javított kezelési eljárásainak kifejlesztésére. Találmányunk megoldást nyújt e szükségletekre, s további előnyöket is biztosít.

Az emlőrák a nők jelentős egészségügyi problémáját jelenti az Egyesült Államokban és szerte a világon. Bár e betegség kimutatásában és kezelésében jelentős előrehaladások tapasztalhatók, nőknél az emlőrák továbbra is a rákos eredetű elhalálozások második leggyakoribb okaként tartható számon, ami az Egyesült Államokban évente több, mint 180 000 nőt érint. Észak-Amerikában a nők emlőrákos megbetegedésének kockázata (teljes élettartamot tekintve) egy a nyolchoz.

Jelenleg nem áll rendelkezésre emlőrák kezelésére univerzálisan sikerrel alkalmazható eljárás. E betegség kezelése jelenleg a (rutinszerű emlőrákszűrésekkel megvalósított) korai diagnosztizáláson és agresszív kezelésen alapul, mely utóbbi sebészeti beavatkozást, sugárterápiát, kemoterápiát vagy hormonterápiát (vagy ezek kombinációját) foglalhatja magában. Egy adott emlőrák kezelésének mikéntjét gyakran különféle prognosztizáló paraméterek (pl. specifikus tumormarkerek analízise) alapján választják ki [ld. pl. Porter-Jordan és Lippman: Breast Cancer 8, 73 (1994)]. Mindazonáltal, az elfogadott markerek alkalmazása gyakran nehezen értelmezhető eredményhez vezet, és az emlőrákos pácienseknél megfigyelhető nagy mortalitás azt jelzi, hogy nagy szükség van e betegség kezelési, diagnosztizálási és megelőzési módszereinek javítására.

A tüdőrák az Egyesült Államokban - férfiak és nők esetében egyaránt - a rákos halálozások leggyakoribb okozója; 1994-ben 172 000 új esetet regisztráltak. A tüdőrákos betegek öt éves túlélési rátája - a betegség diagnosztizáláskori stádiumától függetlenül - csupán 13 %,

szemben a betegség még lokalizált stádiumában detektált esetekre jellemző 46 %-os öt éves túlélési rátával. Mindazonáltal, a tüdőrákos esetek csupán 16 %-át fedezik fel azelőtt, hogy metasztatizálódásuk bekövetkezne.

5 A felsorolt rákos betegségek hatékony gyógykezelésére irányuló kutatások ellenére az emlőrák, vastagbélrák és vastag- és végbélrák hatékony diagnosztizálása és gyógykezelése továbbra is akadályokba ütközik. A fentiek értelmében, nagy szükség van az ilyen és egyéb rákos betegségek javított kezelési és megelőzési eljárásainak kifejlesztésére. Találmányunk megoldást nyújt e szükségletekre, mindamelllett, további előnyöket is biztosít.

10 A találmány egyik szempontjának megfelelően polinukleotidokat tárunk fel, amelyek a következő nukleotidszekvenciák egyikét tartalmazzák:

(a) az 1. vagy 3. azonosítószámú szekvencia legalább 20 szomszédos nukleotidjából álló szekvenciák (amelyek nem azonosak a teljes hosszúságú 1. vagy 3. azonosítószámú szekvenciával);

15 (b) az 1. vagy 3. azonosítószámú szekvenciából vagy az 1. vagy 3. azonosítószámú szekvencia legalább 20 szomszédos nukleotidjából, valamint egy heterológ fúziós partnert kódoló polinukleotidból álló szekvenciák.

A találmány egy következő szempontja értelmében olyan polipeptideket tárunk fel, amelyek egy fenti polinukleotid-szekvencia által kódolt aminosav-szekvenciát tartalmaznak.

20 A találmány szerinti polipeptidek és/vagy polinukleotidok immunogén sajátosságúak, azaz immunreakció (közelebbről, humorális és/vagy celluláris immunreakció) kiváltására képesek, ha, szükség szerint, megfelelő hordozóhoz vannak konjugálva és/vagy adjuvánssal vannak kombinálva.

25 A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti polipeptid-szekvenciák és polinukleotid-szekvenciák fragmensei, változatai és/vagy származékai, melyek immunogén aktivitása legalább kb. 50 %-a, előnyösen legalább kb. 70 %-a, még előnyösebben legalább kb. 90 %-a a 2. vagy 4. azonosítószámú aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptid immunogén aktivitásának vagy az 1. vagy 3. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó polinukleotid által kódolt polipeptid immunogén aktivitásának.

30 Szintén a találmány tárgyát képezik a fentebb leírt polipeptidet kódoló polinukleotidok, az ilyen polinukleotidokat tartalmazó expressziós vektorok, továbbá az ilyen expressziós vektorokkal transzformált vagy transzfektált gazdasejtek.

A találmány további szempontjainak megfelelően gyógyászati készítményeket tárunk fel, amelyek fentebb leírt, találmány szerinti polipeptidet vagy polinukleotidot és fiziológiai

szempontból elfogadható hordozót tartalmaznak.

A találmány előzővel összefüggő szempontja értelmében gyógyászati készítményeket (pl. vakcinakészítményeket) tárunk fel profilaktikus vagy terápiás alkalmazásra. Az ilyen készítmények általában találmány szerinti immunogén polipeptidet vagy polinukleotidot és
5 immunstimulátor anyagot, például, adjuvánst tartalmaznak.

A találmány további szempontjai értelmében olyan gyógyászati készítményeket tárunk fel, amelyek (a) találmány szerinti polipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejtet; és (b) gyógyászati szempontból elfogadható hordozót vagy segédanyagot tartalmaznak. Az antigénprezentáló sejtek jellemző példái közé tartoznak, többek között, a dendritikus sejtek, makrofágok,
10 monociták, fibroblasztok és B-sejtek.

A találmány előzővel összefüggő szempontjainak megfelelően, olyan gyógyászati készítményeket is feltárunk, amelyek (a) találmány szerinti polipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejtet és (b) immunstimulánst tartalmaznak.

A találmány további szempontjainak megfelelően fúziós proteineket tárunk fel, amelyek legalább egy fentebb leírt, találmány szerinti polipeptidet tartalmaznak. Feltárjuk továbbá az ilyen fúziós proteineket kódoló polinukleotidokat, jellemzően fiziológiai szempontból elfogadható hordozót és/vagy immunstimulánst tartalmazó gyógyászati készítmények (pl. vakcinakészítmények) alakjában. A fúziós proteinek több immunogén polipeptidet vagy polipeptid-részletet/polipeptid-változatot tartalmazhatnak (ld. később), és egy vagy több olyan
15 polipeptid-szegmenst is tartalmazhatnak, amelyek a polipeptid(ek) termeltetése, tisztítása és/vagy immunogenitása szempontjából előnyösek.

A találmány további szempontjainak megfelelően eljárásokat tárunk fel immunreakció stimulálására egy páciensben (előnyösen T-sejtes reakció stimulálására emberben), mely eljárások során a páciensnek találmány szerinti gyógyászati készítményt adagolunk. A találmány szerinti eljárások alkalmazhatók tüdőrákban, vastagbélrákban, vastag- és végbélrákban vagy emlőrákban szenvedő betegeknél, mely esetekben az eljárások a betegség gyógykezelésére szolgálnak, továbbá, ilyen betegség kialakulásával veszélyeztetett páciensek esetében megelőzési célból is alkalmazhatók. Közelebről, a találmány szerinti eljárások cripto-antigéneket expresszáló tumort hordozó páciensek esetében alkalmazhatók.
25

A találmány további szempontjainak megfelelően eljárásokat tárunk fel rák kialakulásának gátlására egy páciensben, mely eljárások során a páciensnek találmány szerinti gyógyászati készítményt adagolunk. A szóban forgó eljárások alkalmazhatók tüdőrákban, vastagbélrákban, vastag- és végbélrákban vagy emlőrákban szenvedő betegeknél, mely esetekben az el-
30

járások a betegség gyógykezelésére szolgálnak, továbbá, ilyen betegség kialakulásával veszélyeztetett páciensek esetében megelőzési célból is alkalmazhatók.

A találmány további szempontjainak megfelelően, eljárásokat tárunk fel tumorsejtek biológiai mintából történő eltávolítására, melyek során egy biológiai mintát olyan T-sejtekkel érintkeztetünk, amelyek specifikusan képesek reagálni egy találmány szerinti polipeptiddel. A szóban forgó eljárásokban az érintkeztetési lépést a proteint termelő sejtek eltávolítását elősegítő feltételek mellett és a mintából történő eltávolításhoz elégséges ideig végezzük.

A találmány előzővel összefüggő szempontjainak megfelelően eljárásokat tárunk fel rák kialakulásának páciensben történő gátlására, melyek során a páciensnek fentebb leírtak szerint kezelt biológiai mintát adagolunk.

A találmány további szempontjainak megfelelően, eljárásokat tárunk fel találmány szerinti polipeptidre specifikus T-sejtek serkentésére és/vagy szaporítására, mely eljárások során a T-sejteket - serkentésükhöz és/vagy szaporításukhoz megfelelő feltételek mellett és elégséges ideig - a következők közül egy vagy több anyaggal érintkeztetjük: (i) fentebb leírt polipeptid; (ii) ilyen polipeptidet kódoló polinukleotid; és/vagy (iii) ilyen polipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejt. Szintén a találmány tárgyát képezik a fentebb leírt eljárásokkal előállított T-sejteket tartalmazó izolált T-sejt-populációk.

A találmány egyéb szempontjainak megfelelően, eljárásokat tárunk fel rák kialakulásának páciensben történő gátlására, melyek során a páciensnek találmány szerinti T-sejt-populáció hatásos mennyiségét adagoljuk.

Ezen túlmenően, eljárásokat tárunk fel rák kialakulásának páciensben történő gátlására, melyek a következő lépésekből állnak:

(a) egy páciensből izolált $CD4^+$ és/vagy $CD8^+$ T-sejteket a következők közül egy vagy több vegyülettel, illetve sejtrel érintkeztetünk:

(i) egy találmány szerinti cripto-polipeptid legalább egy immunogén részletét tartalmazó polipeptid;

(ii) ilyen polipeptidet kódoló polinukleotid; és

(iii) ilyen polipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejt; és

(b) a páciensnek a proliferálódott T-sejtek hatásos mennyiségét adagoljuk, gátolva ezáltal a páciensben a rák kialakulását. A proliferálódott sejtek a páciensnek történő beadás előtt, adott esetben, klónozzhatók.

A találmány fenti és egyéb szempontjai az alábbi részletes leírás alapján könnyen érthetőek lesznek. A leírásban említett valamennyi hivatkozást teljes terjedelmében a kitanítás ré-

szének tekintjük.

A következőkben az ábrák és a szekvencia-azonosítók rövid leírását ismertetjük.

Az 1. ábrán a cripto-expresszió vastag- és végbélrákos páciensekben, reverz transzkriptázos polimeráz-láncreakcióval, SybrI-detektálással végzett analízisének eredményeit mutatjuk be (T = tumoros vastagbél; N = ugyanazon páciensből származó egészséges szövet).

A 2. ábrán a cripto-expresszió vastag- és végbélrákos páciensekben, reverz transzkriptázos polimeráz-láncreakcióval, TaqMan-detektálással végzett analízisének eredményeit mutatjuk be (T = tumoros vastagbél; N = ugyanazon páciensből származó egészséges szövet).

A 3. ábrán a cripto-expresszió normál szövetekben, reverz transzkriptázos polimeráz-láncreakcióval, SybrI-detektálással végzett analízisének eredményeit mutatjuk be.

A 4. ábrán a cripto-expresszió normál szövetekben, reverz transzkriptázos polimeráz-láncreakcióval, TaqMan-detektálással végzett analízisének eredményeit mutatjuk be.

Az 5. ábrán a cripto-expresszió különböző sejtvonalakban, reverz transzkriptázos polimeráz-láncreakcióval végzett analízisének eredményeit mutatjuk be.

1. azonosítószámú szekvencia: Cripto-1-polinukleotid;

2. azonosítószámú szekvencia: Cripto-3-polinukleotid;

2. azonosítószámú szekvencia: Cripto-3-poliipeptid-1;

3. azonosítószámú szekvencia: Cripto-1-poliipeptid;

4. azonosítószámú szekvencia: Cripto-3-poliipeptid;

5. azonosítószámú szekvencia: az 5 654 140 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban feltárt Cripto-polinukleotid;

6. azonosítószámú szekvencia: az 5 654 140 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban feltárt Cripto-polinukleotid;

7-10. azonosítószámú szekvenciák: PCR-láncindítók;

11. és 12. azonosítószámú szekvencia: szintetikus Cripto-1-peptidek;

13-94. azonosítószámú szekvenciák: Cripto-1- és Cripto-3-poliipeptidből származó epitópok;

95. azonosítószámú szekvencia: Cripto-1 polinukleotid-változat;

96. azonosítószámú szekvencia: Cripto-1 poliipeptid-változat.

A találmány tárgyát készítmények és azok alkalmazása képezi rák - elsősorban cripto-expresszióval jellemezhető rák és metasztázisok (ideértve a cripto-expresszióval jellemezhető tüdőrákot, vastagbélrákot, vastag és végbélrákot és emlőrákot) - kezelésére és diagnosztizálá-

sára. Ahogy azt később részletesen leírjuk, a találmány szerinti, jellemző készítmények, többek között, polipeptideket (elsősorban immunogén sajátosságú polipeptideket), ilyen polipeptideket kódoló polinukleotidokat, antitesteket és egyéb kötőreagenseket, antigénprezentáló sejteket (APC) és immunrendszeri sejteket (pl. T-sejteket) tartalmaznak.

5 A találmány gyakorlati kivitelezése során - hacsak másképpen nem jelezzük - szakember számára jól ismert virológiai, immunológiai, mikrobiológiai, molekuláris biológiai és rekombináns DNS-technikákat alkalmazunk (melyek közül a leírásban szemléltetés céljából többet is ismertetünk). E technikák részletes leírása az idevonatkozó szakirodalomban megtalálható [ld. pl. Sambrook és mtsai.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. kiadás
10 (1989); Maniatis és mtsai.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1982); "DNA Cloning: A Practical Approach", I. és II. kötet (szerk.: D. Glover); "Oligonucleotide Synthesis", szerk.: N. Gait (1984); "Nucleic Acid Hybridization", szerk.: Hames és Higgins (1985); "Transcription and Translation", szerk.: Hames és Higgins (1984); "Animal Cell Culture", szerk.: R. Freshney (1986); Perbal: "A Practical Guide to Molecular Cloning"
15 (1984)].

A találmány leírásában említett valamennyi publikációt, szabadalmi leírást és szabadalmi bejelentést teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk.

Ahogy a leírásban és az igénypontokban használjuk, az egyes számban alkalmazott "egy", "a" és "az" névelők magukban hordozzák többes számú jelentésüket is, hacsak a szövegösszefüggés nem utal egyértelműen az ellenkezőjére.
20

Polipeptidek

A találmány leírásában a "polipeptid" kifejezést szokványos értelmében használjuk, vagyis aminosav-szekvenciát értünk rajta, melynek hosszúsága nincs definiálva, így a polipeptid kifejezés jelentése a peptidekre, oligopeptidekre és proteinekre egyaránt kiterjed (mely kifejezések egymással felcserélhető módon használunk), ugyanakkor, jelentésébe nem tartoznak
25 bele a polipeptid expresszió utáni módosításai (pl. glikoziláltság, acetiláltság, foszforiláltság, stb.), valamint az egyéb, természetes vagy mesterséges módosítások. A polipeptid lehet teljes protein vagy annak szekvencia-részlete. A találmány szempontjából lényeges polipeptidek olyan aminosav-szekvenciák, amelyek epitópokat, vagyis olyan antigénhatású determinánsokat
30 tartalmaznak, amelyek a polipeptid immunogén sajátosságaiért felelősek és immunreakció kiváltására alkalmasak.

A találmány szerinti jellemző polipeptidek a 2. vagy 4. azonosítószámú szekvenciájú cripto-protein legalább 10 szomszédos aminosavát, előnyösen 20, még előnyösebben 30, 40,

50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 szomszédos aminosavát tartalmazták.

A találmány bizonyos előnyös megvalósítási módjai értelmében a találmány szerinti polipeptidek immunogén sajátosságuk, vagyis cripto-expresszióval jellemezhető ráktól szenvedő betegből származó antiszérummal és/vagy T-sejtekkel immuntesztben (pl. ELISA-tesztben vagy T-sejt-stimulációs tesztben) kimutatható módon reagálnak. Az immunogén aktivitás szkrinélése szakember számára jól ismert technikák alkalmazásával hajtható végre [ld. pl. Harlow és Lane: "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]. Például, a polipeptidet szilárd hordozón immobilizáljuk, majd a betegtől vett vérsavóval érint-
keztetjük, hogy lehetővé tegyük a vérsavóban lévő antitestek immobilizált polipeptidhez történő kötődését. A nem kötődött vérsavó eltávolítása után az antitesteket, például, ¹²⁵I-izotóppal jelölt protein-A alkalmazásával detektálhatjuk.

A találmány szerinti polipeptidek immunogén részletei szintén a találmány tárgyához tartoznak. Ahogy itt használjuk, az "immunogén részlet" kifejezésen egy találmány szerinti, immunogén sajátosságú polipeptid olyan fragmensét értjük, amely a polipeptidet felismerő B-sejtekkel és/vagy T-sejt-felületi antigén-receptorokkal immunológiailag önmaguk is reaktívak (azaz specifikusan kötődnek hozzájuk). Az immunogén részletek általában jól ismert technikák alkalmazásával azonosíthatók [ld. pl.: Paul: "Fundamental Immunology", 3. kiadás, 243-247. old., Raven Press (1993), valamint az abban felsorolt hivatkozások]. A polipeptideket antigénspecifikus antitestekkel, antiszérummal és/vagy T-sejtvonalakkal vagy -klónokkal való reagáló képességükre szkrinélhetjük. Ahogy itt használjuk, egy antiszérum vagy antitest akkor "antigénspecifikus", ha specifikusan kötődik egy adott antigénhez (vagyis ELISA-tesztben vagy más immuntesztben reagál a proteinnel, más proteinekkel azonban nem ad kimutatható reakciót). Az ilyen antiszérumok és antitestek a leírásban ismertetett módon, jól ismert technikák alkalmazásával állíthatók elő.

A találmány egyik előnyös megvalósítási módja szerint egy találmány szerinti polipeptid immunogén részlete olyan polipeptid-fragmens, amely antiszérummal és/vagy T-sejtekkel - például, ELISA-tesztben és/vagy T-sejt-reaktivitási tesztben - a teljes hosszúságú polipeptidénél lényegében nem kisebb reaktivitással reagál. A polipeptid immunogén részletének immunogén aktivitása legalább kb. 50 %-a, előnyösen legalább kb. 70 %-a, legelőnyösebben több, mint kb. 90 %-a a teljes hosszúságú polipeptid immunogenitásának. Néhány esetben olyan előnyös immunogén részletek azonosíthatók, amelyek immunogén aktivitása nagyobb, mint a megfelelő teljes hosszúságú polipeptidé (pl. a teljes hosszúságú polipeptid immunogén

aktivitásának több, mint 100 %-ának vagy több, mint 150 %-ának megfelelő immunogenitás).

A találmány bizonyos egyéb megvalósítási módjaiban a jellemző immunogén polipeptid-részletek közé tartoznak az olyan peptidek, amelyek N-terminális vezetőszekvenciája és/vagy transzmembrán-doménje deletálva van. Más jellemző immunogén polipeptid-részletek - az érett proteinhez viszonyítva - rövid (pl. 1-30 aminosavas, előnyösen 5-15 aminosavas) N- és/vagy C-terminális deléciót tartalmaznak.

A találmány egy további megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti polipeptid egy vagy több olyan polipeptidből (vagy immunogén fragmenséből vagy változatából) is állhat, amely(ek) immunológiailag reaktív(ak) egy találmány szerinti polipeptid (elsősorban itt feltárt aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptid) ellen létrehozott T-sejtekkel és/vagy antitestekkel.

A találmány egy másik megvalósítási módja értelmében olyan polipeptideket tárunk fel, amelyek egy vagy több olyan polipeptidből (vagy ezek immunogén fragmenseiből vagy változataiból) állnak, amely(ek) egy vagy több találmány szerinti polipeptiddel immunológiailag reaktív T-sejtek és/vagy antitestek termelődésének kiváltására képes(ek), vagy amelye(ke)t az itt feltárt polinukleotid-szekvenciákban lévő folytonos nukleinsav-szekvenciák kódol(nak) [(vagy egy vagy több olyan nukleinsav-szekvencia, amely(ek) e nukleinsav-szekvenciákkal mérsékelten vagy nagymértékben sztringens feltételek mellett hibridizálódni képes(ek)].

A találmány egy következő szempontjának megfelelően, olyan polipeptid-fragmenseket tárunk fel, amelyek a találmány szerinti polipeptidek (pl. a 2. vagy 4. azonosítószámú aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptidek vagy az 1. vagy 3. azonosítószámú polinukleotid-szekvencia által kódolt polipeptidek) legalább kb. 5, 10, 15, 20, 25, 50 vagy 100 vagy még több, egymással szomszédos aminosavát tartalmazzák (ideértve valamennyi köztes hosszúságú fragmenst).

A találmány egy következő szempontjának megfelelően a találmány szerinti polipeptidek változatait tárjuk fel. A találmány szerinti polipeptid-változatok teljes hosszúságukra vonatkoztatva (az alábbiakban leírtak szerint végzett meghatározás alapján) jellemzően legalább kb. 70 %-os, 75 %-os, 80 %-os, 85 %-os, 90 %-os, 91 %-os, 92 %-os, 93 %-os, 94 %-os, 95 %-os, 96 %-os, 97 %-os, 98 %-os, 99 %-os vagy még nagyobb fokú azonosságot mutatnak egy találmány szerinti polipeptid-szekvenciával.

A találmány egyik előnyös megvalósítási módja szerint a találmány szerinti polipeptid-fragmensek és -változatok immunológiailag reaktívak egy találmány szerinti teljes hosszúságú polipeptiddel reagáló antitesttel és/vagy T-sejttel.

A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti polipeptid-fragmensek és -változatok egy találmány szerinti, teljes hosszúságú polipeptid-szekvencia immunogén aktivitásának legalább kb. 50 %-ával, előnyösen legalább kb. 70 %-ával, legelőnyösebben legalább kb. 90 %-ával vagy még nagyobb százalékanak kifejtésére képesek.

Ahogy itt használjuk, a "polipeptid-változat" kifejezésen olyan polipeptidet értünk, amely a találmány szerinti polipeptidtől jellemzően egy vagy több aminosavat érintő szubsztitúcióban, delécióban, addícióban és/vagy inszercióban tér el. Az ilyen változatok természetben előforduló vagy szintetikus úton előállított változatok egyaránt lehetnek. Például, a találmány szerinti polipeptid-szekvenciák közül egy vagy több mesterséges módosításnak vethető alá, és a létrehozott változatok immunogén aktivitása az alábbiakban leírt módon és/vagy a szakember számára jól ismert technikák bármelyikének alkalmazásával értékelhető.

A találmány szerinti polipeptidek jellemző változatai közé tartoznak, például, azok, amelyekből egy vagy több részlet (pl. N-terminális vezetőszekvencia vagy transzmembrán-domén) el van távolítva. További jellemző változatok azok, amelyekben az érett protein N- és/vagy C-terminálisáról egy rövid szakasz (pl. 1-30 aminosavas, előnyösen 5-15 aminosavas fragmens) van eltávolítva.

A polipeptid-változatok számos esetben konzervatív szubsztitúciókat tartalmaznak. A "konzervatív szubsztitúció" kifejezés azt jelenti, hogy egy aminosav másik, hasonló tulajdonságú aminosavval van helyettesítve, miáltal a polipeptid másodlagos szerkezete és hidropátias természetes lényegében változatlan marad. Ahogy fentebb említettük, a találmány szerinti polinukleotidok és polipeptidek szerkezetében módosítások hajthatók végre, melyek továbbra is olyan működőképes molekulát eredményeznek, amely kívánatos tulajdonságú (pl. immunogén sajátságú) polipeptid-változatot vagy -származékot kódol. Ha egy találmány szerinti polipeptid egyenértékű vagy javított immunogén változatának vagy részletének létrehozása céljából a polipeptid aminosav-szekvenciájának módosítására van szükség, rendszerint a polipeptidet kódoló DNS-szekvencia egy vagy több kondonját (ld. 1. táblázat) módosítjuk.

Például, bizonyos aminosavak más aminosavakkal helyettesíthetők, anélkül, hogy a protein - például, antitestek antigénkötő régióival vagy szubsztrátmolekulák kötőhelyeivel - interaktív kötési képessége jelentős mértékben csökkenne. Mivel a protein interaktív képessége és természete határozza meg a protein biológiai aktivitását, a protein aminosav-szekvenciájában - és természetesen az azt kódoló DNS nukleotidszekvenciájában is - végrehajthatók bizonyos szubsztitúciók, melyekkel, hasonló tulajdonságú proteinek nyerhetők. Ennek megfelelően,

a találmány szerinti polipeptidek aminosav-szekvenciájában - vagy az azokat kódoló DNS-szekvenciákban - különböző változtatások hajthatók végre, anélkül, hogy biológiai alkalmazhatóságuk vagy aktivitásuk jelentős mértékben csökkenne.

5

1. táblázat

Aminosavak			Kodonok					
Alanin	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cisztein	Cys	C	UGC	UGU				
Aszparaginsav	Asp	D	GAC	GAU				
Glutaminsav	Glu	E	GAA	GAG				
Fenilalanin	Phe	F	UUC	UUU				
Glicin	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Hisztidin	His	H	CAC	CAU				
Izoleucin	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Lizin	Lys	K	AAA	AAG				
Leucin	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Metionin	Met	M	AUG					
Aszparagin	Asn	N	AAC	AAU				
Prolin	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Glutamin	Gln	Q	CAA	CAG				
Arginin	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Szerin	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonin	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valin	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
Triptofán	Trp	W	UGG					
Tirozin	Tyr	Y	UAC	UAU				

A szóban forgó módosítások végrehajtásakor az aminosavak hidropátias indexét kell figyelembe venni. A proteinek interaktív biológiai funkcióját illetően a hidropátias index jelentősége jól ismert [ld. Kyte és Doolittle (1982), melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk]. Elfogadott tény, hogy az aminosavak relatív hidropátias karaktere hozzájárul a protein másodlagos szerkezetéhez, ami, végsős soron, meghatározza a protein más molekulákkal (pl.

10

enzimekkel, szubsztrátokkal, receptorokkal, DNS-ekkel, antitestekkel, antigénekkkel és hasonlókkal) bekövetkező interakcióját. Az aminosavak hidropátiás indexe hidrofóbitásuk és töltési tulajdonságaik alapján határozhatók meg [Kyte és Doolittle (1982)]. Ezek az értékek az egyes aminosavakra a következők: izoleucin: +4,5; valin: +4,2; leucin: +3,8; fenilalanin: +2,8; cisztein/cisztin: +2,5; metionin: +1,9; alanin: +1,8; glicin: -0,4; treonin: -0,7; szerin: -0,8; triptofán: -0,9; tirozin: -1,3; prolin: -1,6; hisztidin: -3,2; glutaminsav: -3,5; glutamin: -3,5; aszparaginsav: -3,5; aszparagin: -3,5; lizin: -3,9; és arginin: -4,5.

Ismeretes, hogy bizonyos aminosavak más, hasonló hidropátiás indexű aminosavakkal helyettesíthetők, melynek eredményeként az eredetihez hasonló biológiai aktivitású (vagyis biológiai funkcióját tekintve egyenértékű) protein jön létre. Az ilyen módosítások végrehajtása során olyan aminosavak egymással történő helyettesítése előnyös, amelyek hidropátiás indexeinek különbsége legfeljebb ± 2 , előnyösebben legfeljebb ± 1 , még előnyösebben legfeljebb $\pm 0,5$. Tudni kell továbbá, hogy a hasonló aminosavak helyettesítése hidrofilitásuk alapján hajtható végre hatékonyan. A 4 554 101 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban (melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk) feltárják, hogy egy protein legnagyobb lokális átlagos hidrofilitása - amelyet egymással szomszédos aminosavainak hidrofilitása ad meg - összhangban van a protein biológiai tulajdonságával.

Ahogy a 4 554 101 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban leírják, az egyes aminosavakra a következő hidrofilitási értékek jelölhetők ki: arginin: +3,0; lizin: +3,0; aszparaginsav: +3,0 $\pm$ 1; glutaminsav: +3,0 $\pm$ 1; szerin: +0,3; aszparagin: +0,2; glutamin: +0,2; glicin: 0; treonin: -0,4; prolin: -0,5 $\pm$ 1; alanin: -0,5; hisztidin: -0,5; cisztein: -1,0; metionin: -1,3; valin: -1,5; leucin: -1,8; izoleucin: -1,8; tirozin: -2,3; fenilalanin: -2,5; triptofán: -3,4. Ismeretes, hogy egy aminosav más, hasonló hidrofilitású aminosavval történő helyettesítése biológiailag egyenértékű, közelebbről, immunológiailag egyenértékű proteint eredményez. Az ilyen módosításokra olyan aminosavak egymással történő helyettesítése előnyös, amelyek hidrofilitási értékének különbsége legfeljebb ± 2 , előnyösebben legfeljebb ± 1 , még előnyösebben legfeljebb $\pm 0,5$.

Ahogy fentebb említettük, az aminosav-szubsztitúciókat általában az aminosav-oldalláncok (pl. hidrofóbitásuk, hidrofilitásuk, töltésük, méretük, stb.) relatív hasonlósága alapján valósíthatjuk meg. A fenti sajátosságok figyelembe vételével a jellemző szubsztitúciók példái a következők: arginin és lizin; glutaminsav és aszparaginsav; szerin és treonin; glutamin és aszparagin; és valin, leucin és izoleucin.

Mindezen túlmenően, a polinukleotidok - *in vivo* stabilitásuk növelése érdekében - további módosításoknak vethetők alá. A lehetséges módosítások közé tartoznak, többek között, a következők: 5' - és/vagy 3' -végi szegélyező szekvenciák hozzáadása; a nukleinsav-vázban a foszfodiészter-kötések foszforotioát- vagy 2' -O-metil-kötésekkel történő helyettesítése; és/vagy nem szokványos bázisok (pl. inozin, quenozin és wybutozin), valamint az adenin, citidin, guanin, timin és uridin acetil-, metil-, tio- és egyéb módosított alakjainak beiktatása.

Az aminosav-szubsztitúciók az aminosavak polaritásának, töltésének, oldékonyságának, hidrofóbításának, hidrofilitásának és/vagy amfipátias természetének alapján is végrehajthatók. Például, a negatív töltésű aminosavak közé tartozik az aszparaginsav és glutaminsav; pozitív töltésű a lizin és arginin; töltés nélküli, poláros oldalcsoportot tartalmazó, hasonló hidrofilitású aminosavak a következők: leucin, izoleucin és valin; glicin és alanin; aszparagin és glutamin; és szerin, treonin, fenilalanin és tirozin. Konzervatív szubsztitúciók a következő csoportokon belül is végrehajthatók: (1) Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr; (2) Cys, Ser, Tyr, Thr; (3) Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; (4) Lys, Arg His; és (5) Phe, Tyr, Trp, His. Mindezen felül - vagy más módon - a változat nem konzervatív módosításokat is tartalmazhat. Az egyik előnyös megvalósítási mód szerint a polipeptid-változatok a natív szekvenciától legfeljebb öt aminosavas szubsztitúcióban, delécióban vagy addícióban térnek el. Ezen túlmenően, vagy más módon, a változatok olyan aminosavak deléciójával vagy addíciójával is módosíthatók, amelyek minimális hatást gyakorolnak a polipeptid immunogenitására, másodlagos szerkezetére és hidropátias természetére.

Ahogy fentebb említettük, a polipeptidek a protein N-terminális végén tartalmazhatnak szignál- (vagy vezető-) szekvenciát, amely a transzláció idején vagy a transzlációt követően irányítja a protein szállítódását. A polipeptid kapcsolószekvenciához vagy egyéb - a polipeptid szintézisét, tisztítását vagy azonosítását elősegítő - szekvenciához (pl. poli-His) vagy a polipeptid szilárd hordozóhoz történő kapcsolását serkentő szekvenciához is konjugálható. Például, a polipeptidet egy immunglobulin Fc-régiójához konjugálhatjuk.

Két polipeptid-szekvencia összehasonlítását illetően, két szekvencia akkor "azonos", ha aminosavaik sorrendje - maximális megfeleltetéssel végzett összehasonlítással - megegyezik. Két szekvencia összehasonlítását rendszerint úgy hajtjuk végre, hogy a szekvenciákat - a szekvencia-hasonlóság lokális régióinak azonosítása és összehasonlítása céljából - egy összehasonlítási ablakon belül hasonlítjuk egymáshoz. Ahogy itt használjuk, az "összehasonlítási ablak" kifejezésen legalább 20, rendszerint kb. 30-75, kb. 40-50 szomszédos pozícióból álló szakaszt értünk, amelyen belül egy szekvencia azonos számú szomszédos pozícióból álló vonatkoztatási

szekvenciával hasonlítható össze (miután a két szekvenciát optimális megfeleltetéssel egymás alá rendeztük).

A szekvenciák optimális egymás alá rendezését ("alignment") - alapértelmezett paraméterek alkalmazásával - a Lasergene bioinformatikai szoftvercsomag Megalign-programjával (DNASTAR, Inc., Madison, WI) végezhetjük. Ez a program több egymás alá rendezési sémát foglal magában, melyek leírása a következő forrásokban található: Dayhoff, M.O.: "A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships", in: "Atlas of Protein Sequences and Structure", National Biomedical Research Foundation", Washington DC, szerk.: Dayhoff, 5. kötet (3. melléklet) 345-358. old. (1978); Hein: Methods in Enzymology 183, 626 (1990); Higgins és Sharp: CABIOS 5, 151 (1989); Myers és Muller: CABIOS 4, 11 (1988); Robinson: Comb. Theor. 11, 105 (1971); Santou és Nes: Mol. Biol. Evol. 4, 406 (1987); Sneath és Sokal: "Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy", Freeman Press, San Francisco, CA (1973); Wilbur és Lipman: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 726 (1983).

Más módon, az összehasonlításhoz a szekvenciák optimális egymás alá rendezése végrehajtható a Smith és Waterman [Add. Apl. Math. 2, 482 (1981)] által leírt lokális azonossági algoritmussal; a Needleman és Wunsch [J. Mol. Biol. 48, 443 (1970)] által leírt azonossági "alignment" algoritmussal; Pearson és Lipman [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444 (1988)] hasonlóságkeresési eljárásaival; ezen algoritmusok számítógépes változataival (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA és TFASTA, melyek a Wisconsin Genetics szoftvercsomag részei (Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) vagy szemrevételezéssel.

A százalékos szekvencia-azonosság és -hasonlóság meghatározására alkalmas algoritmusok előnyös példaként említhető a BLAST és a BLAST 2.0 algoritmus [leírásukat illetően ld. Altschul és mtsai.: Nucleic Acids Res. 25, 3389 (1977); illetve Altschul és mtsai.: J. Mol. Biol. 215, 403 (1990)]. A BLAST és BLAST 2.0 algoritmus - például, az általunk leírt paraméterekkel - alkalmas a találmány szerinti polinukleotidok és polipeptidek százalékos szekvencia-azonosságának meghatározására. A BLAST-analízisek végrehajtására alkalmazható szoftver a National Center for Biotechnology Information intézeten keresztül mindenki számára hozzáférhető. Az aminosav-szekvenciák esetében az összesített pontszám kiszámítására pontozási mátrix alkalmazható. A szótalálatok terjeszkedése - bármely irányban - akkor áll meg, ha a összesített pontszám a maximális elért értékéről "X" mennyiséggel csökken; ha az összesített pontszám nullára vagy az alá csökken (egy vagy több negatív pontszámú aminosav-megfeleltetés felhalmozódása miatt); vagy ha a szekvencia bármely végét elérjük. A BLAST-

algoritmus paraméterei (W, T és X) határozzák meg az egymás alá rendezés érzékenységet és sebességét.

Az egyik előnyös megvalósítási mód szerint a "százalékos szekvencia-azonosságot" két, optimálisan egymás alá rendezett szekvencia legalább 20 pozícióból álló összehasonlítási ablakban történő összehasonlításával határozzuk meg. A polipeptid-szekvencia összehasonlítási ablakba eső részlete - a két szekvencia optimális megfeleltetése érdekében - a deléciókat vagy addíciókat nem tartalmazó vonatkoztatási szekvenciához viszonyítva 20 %-ban vagy kisebb arányban, rendszerint 5-15 %-ban vagy 10-12 %-ban tartalmazhat addíciókat vagy deléciókat (azaz hézagokat). A százalékos azonosság kiszámításához meghatározzuk azon pozíciók számát, amelyekben mindkét szekvenciában azonos aminosav helyezkedik el, ezáltal megkapjuk az azonos pozíciók számát. Ezt elosztjuk a vonatkoztatási szekvencia pozícióinak összes számával (vagyis az összehasonlítási ablak méretével), és százal szorozva megkapjuk a százalékos azonosságot.

A találmány további előnyös megvalósítási módjai értelmében a találmány szerinti polipeptid olyan fúziós polipeptid, amely több, fentebb leírt, találmány szerinti polipeptidet tartalmaz, vagy amely legalább egy találmány szerinti polipeptidet és egy másfajta szekvenciát (pl. ismert tumorproteint) tartalmaz. A fúziós partner, például, T-helper epitópok (előnyösen emberek által felismert T-helper epitópok) biztosításában játszhat szerepet (immunológiai fúziós partner) vagy elősegítheti a protein - eredeti rekombináns proteinnél nagyobb mértékű - termelődését (termelődésfokozók). Bizonyos előnyös fúziós partnerek egyszerre immunológiai és termelődésfokozó fúziós partnerként funkcionálnak. Más fúziós partnerek növelik a polipeptid oldékonyságát vagy elősegítik a polipeptid kívánt intracelluláris kompartmentbe történő célbajuttatását. További fúziós partnerek az affinitási jelölők ("affinity tags"), melyek a polipeptid tisztítását segítik elő.

A fúziós polipeptideket általában standard technikák alkalmazásával állítjuk elő (ideértve a kémiai konjugációt is). A fúziós polipeptidet előnyösen - megfelelő expressziós rendszerben - rekombináns polipeptidként termeltetjük, ami lehetővé teszi, hogy a nem fuzionált polipeptidhez képest fokozott mennyiségben termelődjön. Röviden összefoglalva: a polipeptid-komponenseket kódoló DNS-szekvenciákat külön-külön állítjuk össze és megfelelő expressziós vektorba ligáljuk. Az első polipeptid-komponenst kódoló DNS-szekvencia 3'-végét - kapcsolószekvencia beiktatásával vagy anélkül - a második polipeptid-komponenst kódoló DNS-szekvencia 5'-végéhez ligáljuk, oly módon, hogy a szekvenciák azonos leolvasási fázisba kerüljenek. Ez lehetővé teszi a két szekvencia egyetlen fúziós polipeptiddé történő transzláci-

óját. Az így kapott fúziós polipeptid mindkét polipeptid-komponens biológiai aktivitását megtartja.

Az első és második polipeptid-komponens elválasztására kapcsolópeptid alkalmazható, amely a két komponenst egymástól olyan távolságban tartja, hogy mindkét polipeptid esetében kialakulhasson a másodlagos és harmadlagos szerkezet. A kapcsolópeptid szakember számára jól ismert, standard módszerekkel építhető be a fúziós polipeptidbe. A megfelelő kapcsolópeptid a következő faktorok alapján választható ki: (1) flexibilis, meghosszabbított konformáció felvételének képessége; (2) az első és második polipeptiden lévő funkcionális epitópokkal kölcsönhatásba lépni képes másodlagos szerkezet felvételének képessége; és (3) a polipeptid funkcionális epitópjaival potenciálisan reagáló hidrofób vagy töltött aminosavak hiánya. Az előnyös kapcsolópeptid-szekvenciák glicinből, aszparaginből és szerinből állnak, azonban tartalmazhatnak más, közel semleges aminosavakat (treonint és alanint) is. A kapcsolópeptidként előnyösen alkalmazható aminosav-szekvenciák közé tartoznak a következő forrásokban leírtak: Maratea és mtsai.: *Gene* **40**, 39 (1985); Murphy és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8258 (1986); 4 935 233 és 4 751 180 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás. A kapcsolószekvencia általában kb. 1-50 aminosav hosszúságú. Ha a fúziós polipeptidben az első és második polipeptid-komponens tartalmaz nem esszenciális N-terminális aminosav-régiókat (melyek alkalmasak a funkcionális domének elválasztására és a sztérikus interferencia megakadályozására), nincs szükség kapcsolószekvencia alkalmazására.

Az egymáshoz ligált DNS-szekvenciákat működőképesen megfelelő transzkripció vagy transláció szabályozóelemekhez kapcsoljuk. A DNS expressziójáért felelős szabályozóelemek az első polipeptidet kódoló DNS-szekvenciától kizárólag 5' -irányban helyezkednek el. Hasonlóan, a transláció leállításához szükséges stop-kodonok és a transzkripció terminációs szignálok kizárólag a második polipeptidet kódoló DNS-szekvencia 3' -végén találhatók.

A fúziós polipeptid egy találmány szerinti polipeptidet más immunogén proteinnel (pl. emlékezőreakció kiváltására képes immunogén proteinnel) együtt is tartalmazhat. Az ilyen proteinek példáulként említhető a tetanus-, tuberculosis- és hepatitis-protein [ld. pl. Stoute és mtsai.: *New Engl. J. Med.* **336**, 86 (1997)].

A találmány egyik előnyös megvalósítási módja értelmében az immunológiai fúziós partner *Mycobacterium* fajból származik (pl. *Mycobacterium tuberculosis*-eredetű Ra12-fragmens). Az Ra12-készítményeket és heterológ polinukleotid/polipeptid-szekvenciák expressziójának és/vagy immunogenitásának fokozására irányuló alkalmazási eljárásaikat a 60/158 585 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben tárták fel (melyet teljes terje-

delmében a kitanítás részének tekintünk). Az Ra12 egy olyan polinukleotid-régió, amely a *Mycobacterium tuberculosis* MTB32A-nukleinsavának szekvencia-részlete. Az MTB32A egy 32 kD-os szerin proteáz, melyet a *Mycobacterium tuberculosis* virulens és avirulens törzseiben lévő gén kódol. Az MTB32A nukleotid- és aminosav-szekvenciája ismert [ld. a 60/158 585 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentést, valamint Skeiky és mtsai.: Infection and Immun. 67, 3998 (1999), melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk]. Az MTB32A-kódolószekvencia C-terminális fragmensei nagy mennyiségben termelődnek, és a tisztítási folyamat során szolubilis polipeptidként maradnak fenn. Az Ra12 serkentheti azon heterológ immunogén polipeptidek immunogenitását, amelyekhez fuzionálva van. Az egyik előnyös Ra12 fúziós polipeptid 14 kD-os C-terminális fragmenst tartalmaz, amely az MTB32A 192-323. aminosavainak felel meg. Más előnyös Ra12-polinukleotidok általában legalább kb. 15, legalább kb. 30, legalább kb. 60, legalább kb. 100, legalább kb. 200 vagy legalább kb. 300 egymást követő nukleotidból állnak, és az Ra12-polipeptid egy-egy részletét kódolják. Az Ra12-polinukleotidok natív nukleotidszekvenciát (vagyis Ra12-polipeptidet vagy annak részletét kódoló endogén nukleotidszekvenciát) vagy annak változatát egyaránt tartalmazhatják. Az Ra12-polinukleotid-változatok egy vagy több szubsztitúciót, addíciót, deléciót és/vagy inszerciót is hordozhatnak, oly módon, hogy a kódolt fúziós polipeptid biológiai aktivitása - a natív Ra12-polipeptidet tartalmazó fúziós polipeptidéhez képest - ne csökkenjen jelentős mértékben. A polinukleotid-változatok a natív Ra12-polipeptidet vagy részletét kódoló polinukleotid-szekvenciával legalább kb. 70 %-ban, előnyösebben legalább kb. 80 %-ban, még előnyösebben legalább kb. 90 %-ban azonos nukleotidszekvenciát tartalmaznak.

A találmány további megvalósítási módjai szerint az immunológiai fúziós partner a Gram-negatív *Haemophilus influenzae*-B baktérium D-proteinjéből származik (ld. WO 91/18926 számú nemzetközi közzétételi irat). A D-protein származéka előnyösen a protein kb. első harmadát tartalmazza (pl. az N-terminális végről 100-110 aminosavat), és a D-protein-származék lipidált lehet. A találmány bizonyos előnyös megvalósítási módjai szerint az N-terminálishoz egy lipoprotein-D fúziós partner első 109 aminosavát kapcsoljuk, miáltal a polipeptidet további exogén T-sejt-epitópokkal látjuk el, és fokozzuk *E. coli* sejtekben történő termelődését (ezáltal termelődésfokozó partnerként funkcionál). A lipidfarok biztosítja az antigén antigénprezentáló sejtek számára történő optimális prezentálását. Egy további fúziós partner az influenzavírus nem strukturális NS1-proteinje (hemagglutinin). Rendszerint 81 aminosavból álló N-terminális fragmensét alkalmazzuk, bár a T-helper epitópokat magukban foglaló egyéb fragmensek is megfelelőek.

A találmány egy következő megvalósítási módja szerint immunológiai fúziós partnerként a LYTA néven ismert proteint vagy annak - előnyösen C-terminális - részletét alkalmazzuk. A LYTA-protein a *Streptococcus pneumoniae*-ből származik, amely N-acetil-L-alanin amidázt (LYTA amidáz) szintetizál. A LYTA amidázt a *LytA*-gén kódolja [ld. Gene 43, 265
5 (1986)]. A LYA egy autolizin, amely a peptidoglükán-váz bizonyos kötéseit specifikusa hasítja. A LYTA-protein C-terminális doménje felelős a kolinra vagy bizonyos kolin-analógokra (pl. DEAE) irányuló affinitásáért. E tulajdonságot használták ki a fúziós proteinek expresszáltatására alkalmas *E. coli* C-LYTA-expresszálo plazmidok kifejlesztésére. Az N-terminálisukon C-LYTA-fragmenst tartalmazó hibridproteinek tisztítását ld.: Biotechnology
10 10, 795 (1992). A találmány előnyös megvalósítási módja szerint fúziós polipeptidbe beépíthető a LYTA ismétlődő részlete is, amely a 178. aminosavval kezdődő C-terminális régióban helyezkedik el. Az egyik különösen előnyös ismétlődő részlet a 188-305. aminosavakat foglalja magában.

A találmány egy további jellemző megvalósítási módja értelmében olyan fúziós
15 polipeptideket (és az azokat kódoló polinukleotidat) tárunk fel, amelyekben a fúziós partner célbajuttató szignált tartalmaz, amely képes a polipeptidet endoszomális/lizoszomális kompartmentbe irányítani (ld. 5 633 234 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás). A találmány szerinti immunogén polipeptid ilyen célbajuttató szignállal fuzionálva hatékonyabban asszociálódik a II. osztályú MHC-molekulákkal, ezáltal a polipeptidre specifikus CD4⁺ T-sejtek fokozott *in vivo* stimulációját eredményezi.
20

A fúziós molekula cripto-komponensként előnyösen a teljes hosszúságú, 188 aminosavas Cripto-1-et vagy Cripto-3-at (vagy ezek fragmensét) tartalmazza.

A találmány szerinti polipeptidek jól ismert szintézises és/vagy rekombináns technikák alkalmazásával állíthatók elő (mely utóbbiakat az alábbiakban részletesen ismertetjük). A körülbelül 150 aminosavnál rövidebb polipeptidek - szakember számára jól ismert eljárások alkalmazásával - szintézises úton állíthatók elő. Például, az ilyen polipeptideket a kereskedelmi forgalomban beszerezhető szilárd fázisú technikák bármelyikének alkalmazásával szintetizáljuk, például, a Merrifield-féle szilárd fázisú eljárással, melynek során az aminosavakat egymást követően kapcsoljuk a növekvő aminosav-lánchoz [ld. Merrifield: J. Am. Chem. Soc. 85, 2149
25 (1963)]. A polipeptidek automatizált szintézisének végrehajtására alkalmas készülékek kereskedelmi forgalomban beszerezhetők, például, a Perkin Elmer/Applied BioSystems Divíziótól
30 (Foster City, CA, USA). Az ilyen berendezések a gyártó útmutatásai szerint működtethetők.

A találmány szerinti polipeptidek (ideértve a fúziós polipeptideket is) általában izolálva vannak. Az "izolált" polipeptid kifejezésen azt értjük, hogy a polipeptid eredeti környezetétől el van különítve. Például, egy természetben előforduló protein vagy polipeptid akkor van izolált, ha a természetes rendszerben vele együtt létező anyagok némelyikétől vagy mindegyikétől el van választva. Az ilyen polipeptidek előnyösen tisztítva is vannak, például, legalább kb. 90 %-os, előnyösebben legalább kb. 95 %-os, legelőnyösebben legalább kb. 99 %-os tisztaságúak.

Polinukleotidok

A találmány további szempontjainak megfelelően, polinukleotidokat tárunk fel, amelyek találmány szerinti polipeptideket kódolnak. A "DNS" és "polinukleotid" kifejezéseket lényegében egymással felcserélhető módon használjuk, és olyan DNS-molekulára vonatkoznak, amely egy adott faj össz genomi DNS-étől izolálva van. Ahogy itt használjuk, az "izolált" kifejezés azt jelenti, hogy a polinukleotid egyéb kódolószekvenciáktól lényegében mentes, és nem tartalmaz más kódoló-DNS-ekből származó nagyobb részleteket (pl. nagy kromoszomális fragmenseket, egyéb funkcionális géneket vagy polipeptidet kódoló régiókat). Természetesen ez az eredetileg izolált DNS-molekulára vonatkozik, és nem zárja ki a gének vagy kódoló régiók későbbi mesterséges hozzáadásának lehetőségét.

A találmány szerinti polinukleotidok genomi szekvenciákat, extragenomi és plazmid-kódolta szekvenciákat és kisebb, génsebészeti módszerekkel létrehozott génszakaszokat tartalmazhatnak, melyek proteineket, polipeptideket, peptideket és hasonlókat expresszálnak (vagy ezek expresszálásához adaptálhatók). Az ilyen génszakaszok természetből izoláltak vagy szintetikus úton módosítottak lehetnek.

Ezen túlmenően, a találmány szerinti polinukleotidok lehetnek egyszálúak (kódoló vagy antiszensz szál) vagy kettős szálúak, továbbá lehetnek DNS-molekulák (genomi DNS, cDNS vagy szintetikus DNS) vagy RNS-molekulák. Az RNS-molekulák közé tartoznak a HnRNS-molekulák, amelyek intronokat tartalmaz, és egy az egyben megfelelnek egy DNS-molekulának; valamint az mRNS-molekulák, amelyek nem tartalmaznak intronokat. A találmány szerinti polinukleotid - bár nem szükségszerűen - tartalmazhat további kódoló vagy nem kódoló szekvenciákat is, illetve - szintén nem szükségszerűen - egyéb molekulákhoz és/vagy hordozóhoz lehet kapcsolva.

A polinukleotidok natív szekvenciát (vagyis találmány szerinti polipeptidet/proteint kódoló endogén szekvenciát vagy annak részletét) vagy polipeptid-változatot vagy -származékot (előnyösen immunogén változatot vagy származékot) kódoló szekvenciát tartalmazhatnak.

A polinukleotid-változatok rendszerint tartalmazzak egy vagy több szubsztitúciót, addíciót, deléciót és/vagy inszerciót, előnyösen oly módon, hogy a polinukleotid-változat által kódolt polipeptid immunogenitása az eredeti polinukleotid-szekvencia által kódolt polipeptidéhez képest ne csökkenjen jelentős mértékben. A "változat" kifejezés magában foglalja a xenogén eredetű homológ géneket is.

A találmány további megvalósítási módjai értelmében olyan polinukleotid-fragmenseket tárunk fel, amelyek az 1. vagy 3. azonosítószámú szekvenciával azonos vagy komplementer szekvencia különböző hosszúságú, folytonos szakaszait tartalmazzák. Például, olyan polinukleotidokat tárunk fel, amelyek az 1. azonosítószámú szekvencia legalább kb. 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 vagy még több egymással szomszédos nukleotidját tartalmazzák (ideértve valamennyi köztes hosszúságú polinukleotidot is). A "köztes hosszúságú" kifejezés azt jelenti, hogy a polinukleotidok a megadott értékek közé eső számú nukleotidot is tartalmazhatnak, így pl. 16, 17, 18, 19, stb., 21, 22, 23, stb., 30, 31, 32, stb., 50, 51, 52, 53, stb., 100, 101, 102, 103, stb., 150, 151, 152, 153, stb. nukleotidot, továbbá 200 és 500, illetve 500 és 1000 között (és így tovább) valamennyi egész számú nukleotidot. A találmány szerinti megoldás szempontjából különösen előnyös polinukleotidok a 13-94. azonosítószámú szekvenciákként bemutatott építőpokat kódoló polinukleotidok.

A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében olyan polinukleotidokat tárunk fel, amelyek mérsékelten/nagymértékben sztringens feltételek között képesek egy találmány szerinti polinukleotiddal vagy annak fragmensével vagy annak komplementer szekvenciájával hibridizálódni. A hibridizációs technikák a molekuláris biológiában jártas szakember számára jól ismertek. Például, egy találmány szerinti polinukleotid más polinukleotiddal bekövetkező hibridizációjának tesztelésére alkalmas, mérsékelten sztringens feltételek a következők: előmosás 5xSSC, 0,5 % SDS, 1,0 mM EDTA (pH=8,0) összetételű oldatban; hibridizáció 50-60 °C-on, 5xSSC-oldatban, egy éjszakán keresztül; majd mosás kétszer 65 °C-on 20 percig, mindkét alkalommal - 0,1 % SDS-t tartalmazó - 2xSSC-, 0,5xSSC- és 0,2xSSC-oldatban. Szakember számára kézenfekvő, hogy a hibridizáció sztringenssége egyszerűen szabályozható, például, a hibridizációs oldat sókoncentrációjának és/vagy a hibridizálási hőmérséklet módosításával. Például, egy másik megvalósítási mód szerint, a nagymértékben sztringens hibridizációs feltételek megegyeznek az előzőkkel, azzal a különbséggel, hogy a hibridizálást magasabb hőmérsékleten (pl. 60-65 °C-on vagy 65-70 °C-on) végezzük.

A találmány bizonyos előnyös megvalósítási módjai szerint a fentebb leírt polinukleotidok (pl. polinukleotid-változatok, -fragmensek és hibridizáló szekvenciák) olyan

polipeptideket kódolnak, amelyek immunológiailag reaktívak az 1. vagy 3. azonosítószámú szekvencia polipeptid-szekvenciával. További előnyös megvalósítási módok értelmében az ilyen polinukleotidok olyan polipeptideket kódolnak, amelyek immunogén aktivitása legalább kb. 50 %-a, előnyösen legalább kb. 70 %-a, még előnyösebben legalább kb. 90 %-a egy találmány szerinti polipeptid-szekvencia immunogén aktivitásának.

A találmány szerinti polinukleotidok vagy fragmenseik - függetlenül magának a kódolószekvenciának a hosszúságától - egyéb DNS-szekvenciákkal (pl. promóterekkel, poliadenilációs szignálokkal, restrikciós enzimes felismerési helyekkel, többszörös klónozóhelyekkel, egyéb kódolószegekkel és hasonlókkal) kombinálhatók, azzal, hogy teljes hosszúságukban jelentős mértékű különbségek lehetnek. Ilyenformán, csaknem bármilyen hosszúságú nukleinsav-fragmens alkalmazható, azzal, hogy a teljes hosszúságot az előállítás gyakorlati kivitelezhetősége és a tervezett rekombináns DNS-technológiában való alkalmazhatóság korlátozza. Például, a találmány számos gyakorlati megvalósításában hasznos polinukleotid-szakaszok teljes hosszúsága jellemzően kb. 10000, kb. 5000, kb. 3000, kb. 2000, kb. 1000, kb. 500, kb. 200, kb. 100, kb. 50 bázispár (ideértve valamennyi köztes hosszúságot).

Polinukleotid-szekvenciák összehasonlítását illetően, két szekvencia akkor "azonos", ha a két szekvenciában a nukleotidok sorrendje - maximális megfeleltetésnek megfelelően végzett egymás alá rendezés ("alignment") esetén azonosnak bizonyul. Két szekvencia összehasonlítását - a szekvencia-hasonlóság lokális régióinak azonosítása és összehasonlítása céljából - egy összehasonlítási ablakon belül hajtjuk végre. Ahogy itt használjuk, az "összehasonlítási ablak" kifejezésen legalább 20, rendszerint kb. 30-75, kb. 40-50 szomszédos pozícióból álló szakaszt értünk, amelyen belül egy szekvencia azonos számú szomszédos pozícióból álló vonatkoztatási szekvenciával hasonlítható össze (miután a két szekvenciát optimális megfeleltetéssel egymás alá rendeztük).

A szekvenciák optimális egymás alá rendezését - alapértelmezett paraméterek alkalmazásával - a Lasergene bioinformatikai szoftvercsomag Megalign-programjával (DNASTAR, Inc., Madison, WI) végezhetjük. Ez a program több egymás alá rendezési sémát foglal magában, melyek leírása a következő forrásokban található: Dayhoff, M.O.: "A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships", in: "Atlas of Protein Sequences and Structure", National Biomedical Research Foundation", Washington DC, szerk.: Dayhoff, 5. kötet (3. melléklet) 345-358. old. (1978); Hein: Methods in Enzymology 183, 626 (1990); Higgins és Sharp: CABIOS 5, 151 (1989); Myers és Muller: CABIOS 4, 11 (1988); Robinson: Comb. Theor. 11, 105 (1971); Santou és Nes: Mol. Biol.

Evol. 4, 406 (1987); Sneath és Sokal: "Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy", Freeman Press, San Francisco, CA (1973); Wilbur és Lipman: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 726 (1983).

Más módon, az összehasonlításhoz a szekvenciák optimális egymás alá rendezése ("alignment") a Smith és Waterman [Add. Apl. Math. 2, 482 (1981)] által leírt lokális azonosági algoritmussal; a Needleman és Wunsch [J. Mol. Biol. 48, 443 (1970)] által leírt azonosági "alignment" algoritmussal; Pearson és Lipman [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444 (1988)] hasonlóságkeresési eljárásaival; ezen algoritmusok számítógépes változataival (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA és TFASTA, melyek a Wisconsin Genetics szoftvercsomag részei (Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) vagy szemrevételezéssel hajtható végre.

A százalékos szekvencia-azonosság és -hasonlóság meghatározására alkalmas algoritmusok előnyös példaként említhető a BLAST és a BLAST 2.0 algoritmus [leírásukat illetően ld. Altschul és mtsai.: Nucleic Acids Res. 25, 3389 (1977); illetve Altschul és mtsai.: J. Mol. Biol. 215, 403 (1990)]. A BLAST és BLAST 2.0 algoritmus - például, az általunk leírt paraméterekkel - alkalmas a találmány szerinti polinukleotidok és polipeptidek százalékos szekvencia-azonosságának meghatározására. A BLAST-analízisek végrehajtására alkalmazható szoftver a National Center for Biotechnology Information intézeten keresztül mindenki számára hozzáférhető. Nukleotidszekvenciák esetében az összesített pontszám, például, az "M" paraméter (egyező nukleotid-pár jutalom-pontszáma, minden esetben nagyobb, mint nulla) és az "N" paraméter (nem egyező nukleotidok büntető-pontszáma, minden esetben kisebb, mint nulla) alkalmazásával számítható ki. A szótalalatok terjeszkedése - bármely irányban - akkor áll meg, ha a összesített pontszám a maximális elért értékéről "X" mennyiséggel csökken; ha az összesített pontszám nullára vagy az alá csökken (egy vagy több negatív pontszámú nukleotid-megfeleltetés felhalmozódása miatt); vagy ha a szekvencia bármely végét elérjük. A BLAST-algoritmus paraméterei (W, T és X) határozzák meg az egymás alá rendezés érzékenységet és sebességét. A BLASTN-program (nukleotidszekvenciákhoz) alapértelmezésként 11-es szóhosszúságot (W), 10-es várható értéket használ, míg a BLOSUM62 pontozómátrix [ld. Henikoff és Henikoff: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915 (1989)] a következő paramétereket alkalmazza: egymás alá rendezések (B) = 50, várt érték (E) = 10, M = 5, N = -4 (mindkét szál összehasonlításával).

A "százalékos szekvencia-azonosságot" két, optimálisan egymás alá rendezett szekvencia legalább 20 pozícióból álló összehasonlítási ablakban történő összehasonlításával hatá-

rozzuk meg. A polinukleotid-szekvencia összehasonlítási ablakba eső részlete - a két szekvencia optimális megfeleltetése érdekében - a deléciókat vagy addíciókat nem tartalmazó vonatkoztatási szekvenciához viszonyítva 20 %-ban vagy kisebb arányban, rendszerint 5-15 %-ban vagy 10-12 %-ban tartalmazhat addíciókat vagy deléciókat (azaz hézagokat). A százalékos

5 azonosság kiszámításához meghatározzuk azon pozíciók számát, amelyekben mindkét szekvenciában azonos nukleinsav-bázis helyezkedik el, ezáltal megkapjuk az azonos pozíciók számát. Ezt elosztjuk a vonatkoztatási szekvencia pozícióinak összes számával (vagyis az összehasonlítási ablak méretével), és a kapott eredményt százzal szorozva megkapjuk a százalékos azonosságot.

10 Szakember számára kézenfekvő, hogy a genetikai kód degeneráltsága miatt egy találmány szerinti polipeptidet több nukleotidszekvencia is kódolhat. E polinukleotidok közül néhány minimális mértékben homológ az adott polipeptidet kódoló natív génnel. Mindazonáltal, a kodonfelhasználás különbözőségei miatt változékony polinukleotidok szintén a találmány tárgyát képezik. Ezen túlmenően, a találmány szerinti polinukleotid-szekvenciákat tartalmazó gének alléljai szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak. Az allélok olyan endogén gének,

15 amelyek egy vagy több mutáció (pl. deléciók, addíciók és/vagy szubsztitúciók) eredményeként módosítva vannak. Az allélok által kódolt mRNS és protein, bár nem szükségszerűen, módosított szerkezetű vagy funkciójú. Az allélok standard technikák (pl. hibridizáció, amplifikáció és/vagy adatbázisok szekvenciáinak összehasonlítása) alkalmazásával azonosíthatók.

20 Ennek megfelelően, a találmány egy további megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti polipeptidek immunogén változatainak és/vagy származékainak előállítására mutagenezist, például, helyspecifikus mutagenezist alkalmazunk. E módszerrel - a kódoló polinukleotid mutagenezise révén - a polipeptid-szekvencia specifikus módosításai hajthatók végre. E technikák a szekvencia-változatok előállításának és tesztelésének egyszerű módját

25 biztosítják (például, oly módon, hogy - a fenti megfontolások figyelembe vételével - a polinukleotidba egy vagy több nukleotidszekvencia-módosítást iktatunk be).

A helyspecifikus mutagenezis lehetővé teszi a mutánsok létrehozását, melynek során a kívánt mutációnak megfelelő nukleotidokat és - annak érdekében, hogy a deléciós junkció mindkét oldalán stabil duplex létrehozásához megfelelő méretű és szekvencia-komplexitású lánclindítók álljanak rendelkezésre - kellő számú szomszédos nukleotidot tartalmazó, specifikus

30 oligonukleotid-szekvenciákat alkalmazunk. A mutációk egy adott polinukleotid-szekvenciában magának a polinukleotid tulajdonságainak javítása, módosítása, csökkentése vagy bármely egyéb változtatása céljából és/vagy a kódolt polipeptid tulajdonságainak, aktivitásának, össze-

tételének, stabilitásának vagy elsődleges szekvenciájának módosítása céljából alkalmazhatók.

A találmány bizonyos megvalósítási módjai értelmében a találmány szerinti polinukleotid-szekvenciák mutagenézisét a kódolt polipeptid egy vagy több tulajdonságának (pl. egy polipeptid-vakcina immunogenitásának) módosítása céljából hajtjuk végre. A helyspecifikus mutagenézis technikái szakember számára jól ismertek, és széles körben alkalmazottak a polipeptidok és polinukleotidok változatainak létrehozására. Például, a helyspecifikus mutagenézist gyakran egy DNS-molekula specifikus részletének módosítására alkalmazzuk. Az ilyen megvalósítási módok szerint jellemzően kb. 14-25 nukleotidos vagy hasonló hosszúságú láncindító oligonukleotidot alkalmazunk, és a szekvencia junkciójának mindkét oldalán kb. 5-10 nukleotid kerül módosításra.

A helyspecifikus mutagenézises módszerek során gyakran olyan fágvektort alkalmazunk, amely egyszálú és kettős szálú alakban is létezik. A helyspecifikus mutagenézisre alkalmas vektorok egyik jellemző példája a kereskedelmi forgalomban beszerezhető M13-fág, melynek alkalmazhatósága szakember számára jól ismert. A helyspecifikus mutagenézis céljaira széles körben elterjedt a kettős szálú plazmidok alkalmazása is, ami kiküszöböli a kívánt gén plazmidból fágba történő átvitelét.

A találmány értelmében a helyspecifikus mutagenézist a következők szerint hajtjuk végre: veszünk egy egyszálú vektort (vagy egy kettős szálú vektor két szálát elválasztjuk egymástól), amely magában foglalja a kívánt peptidet kódoló DNS-szekvenciát; előállítjuk - általában szintetikus úton - a kívánt mutáns szekvenciát tartalmazó láncindító oligonukleotidot; ez a láncindítót az egyszálú vektorral hibridizáltatjuk; majd - a mutációt hordozó szál szintézisének befejezése érdekében - DNS-polimerizáló enzimekkel (pl. *E. coli* polimeráz-I Klenow-fragmensével) reagáltatjuk, melynek eredményeként egy heteroduplexet kapunk, amelyben az egyik szál az eredeti, nem mutagenizált szekvenciát, tartalmazza, a másik szál pedig a kívánt mutációt hordozza. Ezután ezt a heteroduplex vektort megfelelő sejtek (pl. *E. coli* sejtek) transzformálására alkalmazzuk, és kisselektáljuk a mutáns szekvenciát tartalmazó rekombináns vektort hordozó klónokat.

A kisselektált, peptidet kódoló DNS-szakaszok szekvencia-változatainak helyspecifikus mutagenézis alkalmazásával történő előállítása lehetséges biztosít a potenciálisan hasznos változatok létrehozására, de ez nem jelent semmiféle korlátozást, mivel léteznek más módszerek is a peptidek szekvencia-változatainak (és az azokat kódoló DNS-szekvenciák) előállítására. Például, a kívánt peptidet kódoló rekombináns vektorokat mutagenizáló reagensekkel (pl. hidroxilaminnal) kezelhetjük, miáltal szekvencia-változatokhoz jutunk. Az e módszerek és eljárás

rások részleteit illetően ld. Maloy és mtsai. (1994); Segal (1976); Prokop és Bajpai (1991); Kuby (1994); és Maniatis és mtsai. (1982); mely forrásokat teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk.

Ahogy itt használjuk, az "oligonukleotid-vezérelte mutagenizáló eljárás" kifejezés
 5 templát-dependens eljárásokra és vektor-közvetítette szaporításra vonatkozik, ami egy specifi-
 kus nukleinsav-molekula koncentrációjának - kezdeti koncentrációjához viszonyított - növeke-
 dését vagy egy detektálható jel (pl. amplifikáció) gyakoriságának növekedését eredményezi.
 Ahogy itt használjuk, az "oligonukleotid-vezérelte mutagenézises eljárás" kifejezésen olyan el-
 járást értünk, amely egy láncindító molekula templát-dependens meghosszabbítását foglalja
 10 magában. A "templát-dependens eljárás" kifejezés RNS- vagy DNS-molekula nukleinsav-szin-
 tézésére vonatkozik, azzal, hogy az újonnan szintetizált nukleinsav-szál szekvenciája a jól is-
 mert komplementer bázispárosodási szabályok szerint épül fel [ld. pl. Watson (1987)]. A vek-
 tor-közvetítette eljárások általában a nukleinsav-fragmens DNS- vagy RNS-vektorba foglalá-
 sát, a vektor klonális sokszorosítását és a sokszorosított (amplifikált) nukleinsav-fragmens ki-
 15 nyerését foglalják magukban. Az ilyen eljárások példáit illetően ld. a 4 237 224 számú egyesült
 államokbeli szabadalmi leírást, melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk.

A találmány szerinti polipeptid-változatok előállításának egy másik módszere szerint a
 rekurzív szekvencia-rekombináció (ld. az 5 837 458 számú egyesült államokbeli szabadalmi le-
 írást) alkalmazható. E módszer szerint a találmány szerinti egyedi (például, fokozott immuno-
 20 gén aktivitású) polinukleotid-változatok "kifejlesztése" céljából egymást követő rekombinációs
 és szkrinelési vagy szelektálási ciklusokat hajtunk végre.

A találmány egy további megvalósítási módja értelmében antiszensz oligonukleotido-
 kat tartalmazó polinukleotidokat tárunk fel. Az antiszensz oligonukleotid bizonyítottan a pro-
 teinszintézis hatékony és célzott inhibitorai, s ezáltal terápiás lehetőséget nyújtanak, melynek
 25 értelmében egy betegség a kialakulásában szerepet játszó proteinek szintézisének gátlásával
 kezelhető. Az antiszensz oligonukleotidok proteinszintézis gátlásában megnyilvánuló haté-
 konysága jól ismert. Például, a poligalaktauronáz és a muszkarin (2. típusú acetilkolin recep-
 tor) szintézise a megfelelő mRNS-szekvenciákra specifikus antiszensz oligonukleotidokkal
 gátolható (ld. az 5 739 119 és 5 759 829 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat).
 30 Ezen túlmenően, az antiszensz gátlást a következők esetében is kimutatták: ciklin nevű sejtma-
 gi protein, a multidrog-rezisztencia gén (MDG1), az ICAM-1, az E-szelektin, az STK-1, a
 corpus striatum GABA_A-receptora és a humán EGF [ld. Jaskulski és mtsai.: Science 240, 1544
 (1988); Vasanthakumar és Ahmed: Cancer Commun. 1(4), 225 (1989); Peris és mtsai.: Brain

Res. Mol. Brain Res. 57(2), 310 (1998); és az 5 801 154, 5 789 573, 5 718 709 és 5 610 288 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírások]. Leírtak továbbá olyan antiszensz konstrukciókat, amelyek különféle rendellenes sejtprolifерációk (pl. rák) gátlására (és ezáltal kezelésére) alkalmasak (ld. az 5 747 470, 5 591 317 és 5 783 683 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat).

A találmány bizonyos megvalósítási módjai értelmében olyan oligonukleotid-szekvenciákat tárunk fel, amelyek egy találmány szerinti polinukleotid-szekvenciához - vagy komplementeréhez - specifikusan kötődni képes szekvencia egészét vagy részét tartalmazza. Az egyik megvalósítási mód szerint az antiszensz oligonukleotidok DNS-t vagy DNS-származékot tartalmaznak. Egy másik megvalósítási mód szerint az oligonukleotidok RNS-ek vagy RNS-származékok. Egy harmadik megvalósítási mód szerint az oligonukleotidok módosított DNS-ek, melyek foszforotioáttal módosított molekulavázat tartalmaznak. Egy negyedik megvalósítási mód szerint az oligonukleotid-szekvenciák peptid-nukleinsavakat vagy azok származékait tartalmazzák. A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös oligonukleotid-szekvenciák mindegyik esetben tartalmaznak olyan régiót, amely komplementer - előnyösebben lényegében komplementer, még előnyösebben teljes mértékben komplementer a találmány szerinti polinukleotid egy vagy több részletével.

Az egy adott génszekvenciára specifikus antiszensz oligonukleotidok szelektálása a kiválasztott célszekvencia (esetünkben patkányeredetű és humán szekvenciák) vizsgálatán és a másodlagos szerkezet, olvadáspont (T_m), kötési energia és relatív stabilitás meghatározásán alapul. Az antiszensz oligonukleotidok - dimereket, hajtű-hurkokat és egyéb másodlagos struktúrákat (melyek csökkenthetik vagy gátolhatják egy gazdasejtben a cél-mRNS-hez történő specifikus kötődést) létrehozó képességük - relatív hiánya alapján is szelektálhatók.

Az mRNS igen előnyös célrégiói az AUG transzlációs kezdőkodonnál vagy annak közelében lévő régiók és azok a szekvenciák, amelyek lényegében komplementerek az mRNS 5' - oldali régióival. A szóban forgó másodlagos szerkezet analízisek és célhely-szelekciók, például, az OLIGO láncindító-analizáló szoftver v.4-es változatának és/vagy a BLASTN 2.0.5 algoritmus szoftver [Altschul és mtsai.: Nucleic Acids Res. 25(17), 3389 (1997)] alkalmazásával hajthatók végre.

Szintén a találmány tárgyához tartozik egy rövid hordozópeptid (a 27 aminosavas MPG) felhasználásával végzett antiszensz célbajuttató eljárás alkalmazása is. Az MPG-peptid a HIV-gp41 fúziós szekvenciájából származó hidrofób domént és az SV40-eredetű T-antigén sejtmagi lokalizációért felelős szekvenciájából származó hidrofil domént tartalmaz [Morris és

mtsai.: Nucleic Acids Res. 25(14), 2730 (1997)]. Kimutatták, hogy az MPG-peptid több molekulája is kötődik az antiszensz oligonukleotidokhoz, ezáltal azok viszonylag nagy (90 %-os) hatékonysággal, kevesebb, mint egy óra alatt bejuttathatók a tenyészetben tartott emlőseredetű sejtekbe. Ezen túlmenően, az MPG-peptiddel bekövetkező interakció jelentős mértékben fokozza az oligonukleotid nukleázos hasítással szembeni ellenállóképességét és a plazmamembránon áthatoló képességét.

A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti polinukleotidokat a találmány szerinti tumorpolipeptidek és tumorproteinek termelődésének tumorsejtekben történő gátlására alkalmas ribozim-molekulák tervezésére és előállítására alkalmazzuk. A ribozimok RNS-protein komplexek, amelyek helyspecifikus módon hasítják a nukleinsavakat. A ribozimok specifikus katalitikus doméneket tartalmaznak, melyek endonukleáz-aktivitással bírnak [Kim és Cech: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(24), 8788 (1987); Forster és Symons: Cell 49(2), 211 (1987)]. Például, nagyszámú ribozim nagy specifitással gyorsítja fel a foszfoészter-transzfer reakciókat, gyakran egy oligonukleotid-szubsztrát több foszfoészter-kötése közül csak egyet hasítva [Cech és mtsai.: Cell 27, 487 (1981); Michel és Westhof: J. Mol. Biol. 216, 585 (1990); Reinhold-Hurek és Shub: Nature 357, 173 (1992)]. Ez a specifitás annak tudható be, hogy a szubsztrát a kémiai reakciót megelőzően - specifikus bázispárosodási kölcsönhatások révén - a ribozim belső "útmutató" ("guide") szekvenciájához (IGS) kötődik.

Jelenleg a természetben előforduló enzimatis RNS-ek hat alapvető változata ismeretes, melyek mindegyike - fiziológiai feltételek mellett - *in trans* katalizálja az RNS foszfodiészter-kötéseinek hidrolízisét (és ezáltal egyéb RNS-molekulákat képesek hasítani). Az enzimatis aktivitású nukleinsavak működésének első lépése általában a cél-RNS-hez történő kötődés. Ez a kötődés az enzimatis nukleinsav célszekvenciát megkötő részletén keresztül valósul meg, amely a molekula cél-RNS-t hasító enzimatis részletének közvetlen közelében helyezkedik el. Ilyenformán, az enzimatis nukleinsav először felismeri, majd - komplementer bázispárosodás révén - megköti a cél-RNS-t, és a pontos helyen való megkötődést követően enzimatisan hasítja a cél-RNS-t. Egy cél-RNS stratégiai hasítása azt eredményezi, hogy az RNS nem lesz képes a kódolt protein szintézisének vezérlésére. Miután az enzimatis aktivitású nukleinsav megkötötte és hasította a cél-RNS-ét, leválik az RNS-ről, hogy újabb cél-RNS-t keressen, és tovább ismétlődhet a megkötődés/hasítási ciklus.

A ribozimok enzimatis természete számos technikánál előnyösebb alkalmazást tesz lehetővé [ilyen pl. az antiszensz technika (melynek során egy nukleinsav-molekula egyszerűen

kötődik egy cél-nukleinsavhoz, gátolva ezáltal annak transzlációját), mivel a ribozim gyógykezeléshez szükséges koncentrációja kisebb, mint egy antiszensz oligonukleotidé. Ez az előny tükrözi a ribozim enzimatisz aktivitást kifejtő képességét. Ennek megfelelően, egy ribozim-molekula képes több cél-RNS-molekula hasítására, sőt, a ribozim rendkívül specifikus inhibitor, melynek gátlási specifikitása nemcsak a cél-RNS-hez történő kötődés bázispárosodási mechanizmusától, hanem a cél-RNS hasításának mechanizmusától is függ. A hasítási hely közelében lévő egyedüli hibás bázispárosodások vagy bázisszubsztitúciók teljes mértékben megszüntethetik a ribozim katalitikus aktivitását [ld. Woolf és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7305 (1992)]. Ilyenformán, egy ribozim hatásának specifikitása nagyobb, mint az ugyanazon RNS-helyhez kötődő antiszensz oligonukleotidé.

Az enzimatisz aktivitású nukleinsav-molekulára a következő motívumok lehetnek jellemzők: kalapácsfej, hajtú, hepatitis- δ vírus, I. csoportos intron vagy RNáz-P RNS (RNS "guide" szekvenciával együtt) vagy neurospora VS RNS-motívum. A kalapácsfej-motívum példáit Rossi és mtsai. [Nucleic Acids Res. 20, 4559 (1992)] írták le. A hajtú-motívumok leírását illetően ld. Hampel és mtsai.: EP 0360257 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés; Hampel és Tritz: Biochemistry 28, 4929 (1989); Hampel és mtsai.: Nucleic Acids Res. 18, 299 (1990); és 5 631 359 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás. A hepatitis- δ vírus motívum egyik példáját Perrotta és Been [Biochemistry 31, 11843 (1992)], az RNáz-P-motívum példáját Guerrier-Takada és mtsai. [Cell 35, 849 (1983)] írták le. A neurospora VS RNS ribozim-motívumot Collins tárta fel [ld. Saville és Collins: Cell 61, 685 (1990); Saville és Collins: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8826 (1991); Collins és Olive: Biochemistry 32, 2759 (1993)]. Az I. csoportos intron példáját a 4 987 071 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban tárták fel. Ami a találmány szerinti enzimatisz aktivitású nukleinsavat illetően lényeges, hogy specifikus szubsztrátkötő-helyet tartalmaz, amely egy vagy több cél-RNS-régióval komplementer, és a szubsztrátkötő-helyen belül vagy annak környékén olyan nukleotidszekvenciát tartalmaz, amely a molekula számára RNS-hasító aktivitást kölcsönöz. Ennek megfelelően, a ribozim-konstrukciók szerkezete nem korlátozódik kizárólag a fentebb említett motívumokra.

A ribozimok a WO 93/23569 és WO 94/02595 számú nemzetközi közzétételi iratokban (mindkettőt teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintjük) leírtak szerint tervezhetők meg, és *in vitro* és *in vivo* tesztelés céljára szintetizálhatók. Az ilyen ribozimok célbajuttatáshoz is kialakíthatók. Bár speciális példákat adunk meg, szakember számára kézenfekvő, hogy szükség esetén más, egyenértékű cél-RNS-ek is alkalmazhatók.

A ribozim-aktivitás a ribozim kötőkarjai hosszúságának változtatásával optimalizálható, vagy kémiai szintézissel olyan ribozimok állíthatók elő, amelyek a vérsavóban lévő ribonukleázok által történő lebontásukat megakadályozó módosításokat hordoznak (ld. pl. a WO 92/07065, WO 93/15187 és WO 91/03162 számú nemzetközi közzétételi iratokat, a 5 92110298.4 számon közzétett európai szabadalmi bejelentést, az 5 334 711 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást, valamint a WO 94/13688 számú nemzetközi közzétételi iratot, melyekben az enzimatis aktivitású RNS-molekulák cukorkomponenseinek különböző kémiai módosításait tárják fel), vagy olyan módosításokat hordoznak, amelyek a sejtekben fokozzák hatékonyságukat, és a "stem II" bázisok eltávolítása, miáltal csökken az RNS-szintézis ideje és 10 mérséklődnek a kémiai követelmények.

Sullivan és mtsai. a WO 94/02595 számú nemzetközi közzétételi iratban eltárták az enzimatis RNS-molekulák célbajuttatásának általános eljárásait. A ribozimok szakember számára jól ismert, különféle eljárások alkalmazásával juttathatók be a sejtekbe. E módszerek jellemző példái közé tartoznak, többek között, a liposzómákba foglalás, az iontoforézis vagy 15 egyéb hordozókba (pl. hidrogélekben, ciklodextrinekbe, biológiailag lebontható nanokapszulákba és bioadhezív mikrogömbökbe) történő ágyazás. Bizonyos indikációk esetén a ribozimok közvetlenül *ex vivo* juttathatók be a sejtekbe vagy szövetekbe (a fentebb említett hordozókkal együtt vagy azok nélkül). Más módon, az RNS/hordozó kombináció lokálisan juttatható be, pl. közvetlen inhalálással vagy közvetlen injektálással vagy katéter, infúziós 20 pumpa vagy stent alkalmazásával. A bejuttatás egyéb módjai közé tartozik, többek között, az intravaszkuláris, intramuszkuláris, szubkután vagy ízületi injektálás, az aeroszolos belélegeztetés, orális adagolás (tabletta vagy pirula alkalmazásával), valamint a topikus, szisztémás, okuláris, intraperitoneális és/vagy intrathecalis adagolás. A ribozimok célbajuttatásának és adagolásának részletes leírását illetően ld. a WO 94/02595 és WO 93/23569 számú nemzetközi köz- 25 zétételi iratokat, melyeket teljes terjedelmükben a kitanítás részének tekintünk.

A ribozim(ok) nagy koncentrációjának sejtekben történő felhalmozásának egy másik lehetősége a ribozimot kódoló szekvenciák DNS-expressziós vektorba történő beépítése. A ribozim-szekvenciák transzkripcióját az eukarióta RNS-polimeráz-I, RNS-polimeráz-II vagy RNS-polimeráz-III (pol-I, pol-II, illetve pol-III) szabályozza. A pol-II- vagy pol-III-promóter 30 szabályozása alatt létrejött transzkriptumok valamennyi sejtben nagy mennyiségben expresszálódnak; egy adott pol-II-promóter adott sejttypusban jelenlévő mennyisége a gén promóter közelében lévő szabályozószekvenciáinak (erősítőszekvenciák, stb.) természetétől függ. Prokarióta RNS-polimeráz promóterek szintén alkalmazhatók, feltéve, hogy a prokarióta

RNS-polimeráz termelődik a megfelelő sejtekben. Az ilyen promóterek szabályozása alatt expresszált ribozimokról bebizonyosodott, hogy emlőseredetű sejtekben is működőképesek. Az ilyen transzkripció egységeket számos különböző - emlőseredetű sejtekbe történő bejutatásra alkalmas - vektorba beépíthetjük, így például, többek között, plazmid-DNS-vektorokba, 5 virális DNS-vektorokba (pl. adenovírus vagy adeno-asszociált vektorokba) vagy virális RNS-vektorokba (pl. retrovírus, semliki forest vírus vagy sindbis vírus vektorokba).

A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében peptid-nukleinsavakat (PNS-eket) tárunk fel. A PNS egy DNS-utánzó molekula, amelyben a nukleobázisok pszedopeptid-vázhoz kapcsolódnak [ld. Good és Nielsen: *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10 7(4), 431 (1997)]. A PNS számos olyan eljárásban alkalmazható, amelyben hagyományosan RNS vagy DNS használatos. Bizonyos eljárásokban a PNS-szekvenciák jobb teljesítményt nyújtanak, mint a megfelelő RNS- vagy DNS-szekvenciák, és RNS-re vagy DNS-re nem jellemző tulajdonságokkal bírnak. A PNS-ek előállításának, tulajdonságainak és alkalmazási eljárásainak összefoglaló áttekintését ld. Corey: *Trends Biotechnol.* 15(6), 224 (1997). 15 Bizonyos megvalósítási módokban előállíthatunk olyan PNS-szekvenciákat, amelyek az ACE-mRNS-szekvencia egy vagy több részletével komplementerek, és az ilyen PNS-ek az ACE-specifikus mRNS translációjának szabályozására, módosítására vagy csökkentésére, és ezáltal egy gazdasejtben az ACE-aktivitás módosítására alkalmazhatók.

A PNS-ekben a DNS normál foszfodiészter-vázát 2-amino-etil-glicin kötések helyettesítik [Nielsen és mtsai.: *Science* 254, 1497 (1991); Hanvey és mtsai.: *Science* 258, 1481 (1992); Hyrup és Nielsen: *Bioorg. Med. Chem.* 4, 5 (1996)]. E szerkezetnek három lényeges következménye van: először is, ellentétben a DNS- vagy foszforotioát-oligonukleotidokkal, a PNS-ek semleges molekulák; másodszor, a PNS-ek akirálisak, így nincs szükség sztereoszelektív szintézis kifejlesztésére; és harmadszor, a PNS-szintézishez a szilárd fázisú peptid-szintézis standard Boc- vagy Fmoc-eljárásai alkalmazhatók (más módszerek, mint pl. a 25 Merrifield-féle szintézis mellett).

PNS-monomerek vagy "ready-made" oligomerek a PerSeptive Biosystems-től (Framingham, MA, USA) vásárolhatók. A Boc- vagy Fmoc-eljárással végzett PNS-szintézis manuális vagy automatizált módszerekkel egyszerűen végrehajtható [Norton és mtsai.: *Bioorg. Med. Chem.* 3(4), 437 (1995)]. A manuális módszer kémiaiilag módosított PNS-ek előállítására 30 vagy egymással közeli rokonságban álló PNS-ek családjainak egyidejű szintézisére is alkalmas.

Egy adott PNS-szintézis sikere - csakúgy, mint a peptidszintézis esetében - a kiválasztott szekvencia tulajdonságaitól függ. Például, bár a PNS-ekbe a nukleotid-bázisok elméle-

tileg bármely kombinációja beépíthető, a szomszédos purinok jelenléte a termékben egy vagy több gyök deléciójához vezethet. E probléma ismeretében a szomszédos purinokat tartalmazó PNS-ek előállítása esetén javasolható a valószínűleg sikertelenül hozzáadott gyökök kapcsolásának megismétlése. Ezt követően a RNS-eket reverz fázisú, nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával tisztíthatjuk, ami a peptidek szintézise esetén tapasztalhatóhoz hasonló hozamot és terméktisztaságot eredményez.

A PNS-ek adott célnak megfelelő módosításait az aminosavak szilárd fázisú szintézis során végzett hozzákapcsolásával vagy karboxilcsoportot tartalmazó vegyületek szabad N-terminális aminhoz történő kapcsolásával hajthatjuk végre. Más módon, a PNS-ek a szintézis után - a molekulába beépített lizinhez vagy ciszteinhez végzett kapcsolással - is módosíthatók. A PNS-ek módosításainak egyszerűsége elősegíti jobb oldékonyságuknak vagy specifikus funkcionális követelményeknek megfelelő optimalizálásukat. Szintézist követően a PNS-ek és származékaik azonossága tömegspektrometriával ellenőrizhető. A PNS-ek módosításait és alkalmazásait illetően ld. pl. Norton és mtsai.: *Bioorg. Med. Chem.* 3(4), 437 (1995); Petersen és mtsai.: *J. Pept. Sci.* 1(3), 175 (1995); Orum és mtsai.: *Biotechniques* 19(3), 472 (1995); Footer és mtsai.: *Biochemistry* 35, 10673 (1996); Griffith és mtsai.: *Nucleic Acids Res.* Pardridge és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5592 (1995); Boffa és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1901 (1995); Gambacorti-Passerini és mtsai.: *Blood* 88, 1411 (1996); Armitage és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12320 (1997); Seeger és mtsai.: *Biotechniques* 23, 512 (1997). Az 5 700 922 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban PNS-DNS-PNS kiméramolekulákat és alkalmazásukat tárják fel diagnosztikai célokra, proteinek organizmusban történő módosítására és gyógyszerekre érzékeny állapotok kezelésére.

A PNS-ek antiszensz kötődési tulajdonságainak karakterizálási eljárásait Rose [*Anal. Chem.* 65, 3549 (1993)] és Jensen és mtsai. [*Biochemistry* 36, 5072 (1997)] írták le. Rose leírása szerint a PNS-ek komplementer oligonukleotidjukhoz történő kötődésének meghatározására kapilláris gélelektroforézist alkalmaztak, amellyel a relatív kötési kinetikai és sztöchiometriai méréseket végeztek. Jensen és mtsai. BIAcore™-technika alkalmazásával hasonló típusú méréseket végeztek.

A PNS-ek egyéb alkalmazásait korábban már leírták, illetve szakember számára jól ismertek. Ezek közé tartoznak a következők: DNS-szál invázió, antiszensz gátlás, mutációs analízis, transzkripció erősítők, nukleinsav-tisztítás, transzkripcionálisan aktív gének izolálása, transzkripció faktor kötődésének blokkolása, genomhasítás, bioszenzorok, *in situ* hibridizáció és hasonló.

Polinukleotidok karakterizálása és expresszáltatása

A találmány szerinti polinukleotidok előállítására és/vagy manipulálására a különféle, jól ismert technikák bármelyike alkalmazható [általános leírást ld. Sambrook és mtsai.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY (1989) és hasonló források].

A találmány további megvalósítási módjai értelmében a találmány szerinti polipeptideket, fúziós proteineket vagy azok funkcionális megfelelőit kódoló polinukleotid-szekvenciák (vagy fragmenseik) rekombináns DNS-molekulákban a polipeptid megfelelő gazdasejtben történő expresszáltatásának szabályozására alkalmazhatók. A genetikai kód degeneráltsága miatt lényegében azonos vagy funkcionálisan egyenértékű aminosav-szekvenciát kódoló egyéb DNS-szekvenciák is előállíthatók, melyek egy adott polipeptid klónozására és expresszáltatására alkalmazhatók.

Bizonyos esetekben előnyös lehet olyan - polipeptidet kódoló - nukleotidszekvenciákat előállítani, amelyek nem természetes kodonokat tartalmaznak. Például, a protein expressziójának fokozása vagy kívánatos tulajdonságú (pl. a természetben előforduló szekenciából képződő transzkriptumnál hosszabb felezési idejű) rekombináns RNS-transzkriptum előállítása céljából egy adott prokarióta vagy eukarióta gazda által előnyben részesített kodonokat alkalmazhatunk.

Ezen túlmenően, a találmány szerinti polinukleotid-szekvenciák a polipeptidet kódoló szekvenciák különböző okokból történő módosítása érdekében (például, többek között, a géntermék klónozása, érési folyamata és/vagy expressziója módosítása miatt) szakember számára jól ismert eljárások alkalmazásával génszerkezeti manipulációnak vethetők alá. Például, a nukleotidszekvenciák genetikai manipulálására génfragmensek és szintetikus oligonukleotidok véletlenszerű fragmentálással végzett összekeverése és polimeráz-láncreakcióval végzett újrarendezése alkalmazható. Ezenfelül, új restrikciós felismerési helyek inszertálására, a glikozilációs mintázatok módosítására, a kodon-preferencia megváltoztatására, "splicing"-változatok létrehozása vagy mutációk beiktatása érdekében helyspecifikus mutagenézist végezhetünk.

A találmány egy következő megvalósítási módja szerint - fúziós proteint kódoló szekvencia létrehozása céljából - természetes, módosított vagy rekombináns nukleinsav-szekvenciákat heterológ szekvenciához ligálhatunk. Például, peptidkönyvtárak polipeptid-aktivitás inhibitoraira történő szkrínelés céljából hasznos lehet olyan kiméra protein előállítása, amelyet kereskedelmi forgalomban beszerezhető antitest felismerni képes. Genetikai manipulációval létrehozhatunk olyan fúziós proteint, amely a polipeptid és a heterológ protein között hasítási he-

lyet tartalmaz, miáltal a polipeptid lehasítható és elválasztható a heterológ molekulárisztól.

A kívánt polipeptidet kódoló szekvenciák - teljes egészükben vagy részben - kémiai eljárásokkal szintetizálhatók [ld. pl. Caruthers és mtsai.: Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215, (1980); Horn és mtsai.: Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232 (1980)]. Más módon, kémiai eljárások alkalmazásával magát a proteint is szintetizálhatjuk. Például, a peptidszintézist különféle szilárd fázisú technikák alkalmazásával végezhetjük [Roberge és mtsai.: Science 269, 202 (1995)], és automata peptidszintetizáló készüléket (pl. ABI 431 típusú peptidszintetizátor; Perkin Elmer, Palo Alto, CA) is alkalmazhatunk.

Az újonnan szintetizált peptidet preparatív nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával [ld. pl. Creighton: "Proteins, Structures and Molecular Principles, WH Freeman and Co., New York, N.Y. (1983)] vagy más, hasonló eljárással tisztíthatjuk. A szintetikus peptid összetételét aminosav-analízissel vagy szekvenálással (pl. Edman-lebontással) ellenőrizhetjük. Ezen túlmenően, polipeptid-változat létrehozása céljából egy polipeptid aminosav-szekvenciája (vagy bármely része) a közvetlen szintézis során módosítható és/vagy kémiai módszerekkel egyéb proteinekből származó szekvenciákkal vagy egyéb részletekkel kombinálható.

Egy kívánt polipeptid expresszálatása érdekében a polipeptidet kódoló nukleotid-szekvenciák - vagy funkcionális megfelelőik - alkalmas (azaz az inszertált kódolószekvencia transzkripciójához és transzlációjához szükséges elemeket tartalmazó) expressziós vektorba inszertálhatók. A polipeptideket kódoló szekvenciákat és megfelelő transzkripciós és transzlációs szabályozóelemeket tartalmazó expressziós vektorok létrehozására szakember számára jól ismert, standard eljárások alkalmazhatók. E módszerek közé tartoznak az *in vitro* rekombináns DNS-technikák, szintézises technikák és *in vivo* genetikai rekombinációs technikák, melyek leírását illetően ld. pl. Sambrook és mtsai.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. (1989); és Ausubel és mtsai.: "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, New York, N.Y. (1989)].

A polinukleotidok inszertálására és expresszálatására számos expressziós vektor/gazdasejt-rendszer alkalmazható, melyek jellemző példái közé tartoznak, többek között, a következők: rekombináns bakteriofággal, plazmiddal vagy kozmiddal transzformált mikroorganizmusok, pl. baktériumok; élesztőkben alkalmazható expressziós vektorokkal transzformált élesztősejtek; virális expressziós vektorokkal (pl. baculovírussal) fertőzött rovarsejt-rendszerek; virális expressziós vektorokkal - pl. karfiolmozaikvírussal (CaMV) vagy dohánymozaikvírussal (TMV) - vagy bakteriális expressziós vektorokkal (pl. Ti-plazmiddal vagy pBR322-plazmiddal) transzformált növénysejt-rendszerek; valamint állati eredetű sejtszisztemek.

Az expressziós vektorban lévő "szabályozóelemek" olyan, nem transzlálódó régiók (erősítőszekvenciák, promóterek és 5' - és 3' -oldali nem transzlálódó régiók), melyek a transzkripció és transzláció végrehajtása érdekében kölcsönhatásba lépnek a gazdasejt celluláris proteinjeivel. Az ilyen elemek hosszúsága és specifitása változó. Az alkalmazott vektortól és gazdasejttől függően különféle transzkripciós és transzlációs szabályozóelemek (köztük konstitutív és indukálható promóterek) alkalmazhatók. Például, bakteriális rendszerben végzett klónozáshoz indukálható promóterek alkalmazhatók, mint például a pBLUESRIPT-fágemid (Stratagene, La Jolla, Kalifornia, USA) vagy a pSPORT1-plazmid (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) hibrid lacZ-promótere és hasonló. Emlőssejt-rendszerekben általában emlőseredetű génekből vagy emlősöket fertőző vírusokból származó promóterek alkalmazhatók előnyösen. Ha a polipeptidet kódoló szekvencia több kópiáját tartalmazó sejtvonal létrehozására van szükség, SV40-en vagy EBV-n alapuló - megfelelő szelektálható markereket tartalmazó - vektorok alkalmazhatók.

Bakteriális rendszerekben - a termeltetett polipeptid tervezett felhasználásától függően - sokféle expressziós vektor alkalmazható. Például, ha a polipeptid nagy mennyiségének termeltetésére van szükség (pl. antitestek indukálása céljából), olyan vektorok alkalmazhatók előnyösen, amelyek könnyen tisztítható fúziós proteinek nagy mennyiségben történő termelődését eredményezik. Az ilyen vektorok közé tartoznak, többek között, a multifunkcionális *E. coli* klónozó és expressziós vektorok, mint pl. a BLUESCRIPT-vektor (Stratagene), amelybe a kérdéses polipeptidet kódoló szekvencia a β -galaktozidáz N-terminális metioninját és azt követő hét aminosavat kódoló szekvenciával azonos leolvasási fázisban inszertálható, miáltal hibrid protein termelődik; a pIN-vektorok [Van Heeke és Schuster: *J. Biol. Chem.* **264**, 5503 (1989)], és hasonló. A pGEX-vektorok (Promega, Madison, Wis., USA) szintén alkalmasak idegen polipeptidek glutation S-transzferázzal (GST) alkotott fúziós proteinjeinek termeltetésére. Az ilyen fúziós proteinek általában oldékonyak, és feltárt sejtekből - glutation-agaróz gyöngyökön végzett adszorpcióval, majd szabad glutation jelenlétében történő eluálással - egyszerűen tisztíthatók. Az ilyen rendszerekben előállított proteinek úgy tervezhetők meg, hogy heparin, trombin vagy Xa-faktor proteázos hasítási helyeket tartalmazzanak, miáltal a klónozott polipeptid könnyen lehasítható a GST-ről.

A *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgombában számos - konstitutív vagy indukálható promótereket (pl. alfa-faktor, alkohol oxidáz és PGH promótert) tartalmazó - vektor alkalmazható [áttekintést ld. Ausubel és mtsai.: "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, New York, N.Y. (1989); Grant és mtsai.: *Methods Enzymol.* **153**, 516 (1987)].

Növényi expressziós vektorok alkalmazása esetén a polipeptideket kódoló szekvenciák expressziójának szabályozására számos promóter alkalmazható. Például, virális promóterek (pl. a karfiolmozaikvírus 35S- és 19S-promótere) önmagukban vagy a TMV-ből származó omega-vezetőszekvenciával [Takamatsu: EMBO J. 6, 307 (1987)] kombinálva alkalmazhatók.

5 Más módon, alkalmazhatunk növényi promótereket is, mint pl. a RUBISCO kis alegységét vagy hősokk-promótereket [ld. Coruzzi és mtsai.: EMBO J. 3, 1671 (1984); Broglie és mtsai.: Science 224, 838 (1984); Winter és mtsai.: Results Probl. Cell Differ. 17, 85 (1991)]. Ezek a konstrukciók közvetlen DNS-transzformációval vagy patogén-közvetítette transzfekcióval juttathatók be a növényi sejtekbe. Az e célra alkalmas technikák leírása számos forrásban
10 megtalálható [ld. pl. Hobbs vagy Murry, a McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (McGraw Hill, New York, N.Y., 1992) 191-196. oldalain].

Polipeptid termeltetésére rovarsejt-rendszer is alkalmazható. Például, az egyik ilyen rendszerben idegen gének *Spodoptera frugiperda* sejtekben vagy *Trichoplusia* lárvákban történő expresszáltatására alkalmas vektorként *Autographa californica* sejtmagi poliherdózis vírus (AcNPV) alkalmazunk. A polipeptidet kódoló szekvenciák a vírus nem esszenciális régiójába (pl. a poliherdín-génbe), a poliherdín-promóter szabályozása alá klónozhatók. A polipeptidet kódoló szekvencia sikeres inszerciója a poliherdín gént inaktívvá tesz, és burok-protein nélküli rekombináns vírus létrejöttét eredményezi. Ezt követően a rekombináns vírusokkal, például, *S. frugiperda* sejtek vagy *Trichoplusia* lárvák fertőzhetők meg, és a kívánt polipeptid ezekben termeltethető [Engelhard és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 3224 (1994)].
15
20

Emlőseredetű gazdasejtekben számos vírusalapú expressziós rendszer alkalmazható. Például, ha expressziós vektorként adenovírust alkalmazunk, a kívánt polipeptidet kódoló szekvenciákat adenovírus-eredetű - kései promóterből és három részes vezetőszekvenciából álló - transzkripció/transzláció komplexbe ligálhatjuk. A vírusgenom nem esszenciális E1- vagy E3-régiójába végzett inszercióval olyan életképes vírust kapunk, amely a megfertőzött gazdasejtekben képes a polipeptid termeltetésére [Logan és Shenk: Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 3655 (1984)]. Ezenfelül, emlőseredetű gazdasejtekben az expresszió fokozására transzkripció erősítőszekvenciák (pl. a Rous sarcomavírus erősítőszekvenciája) alkalmazható.
25

30 A kívánt polipeptidet kódoló szekvenciák hatékonyabb transzlációja érdekében specifikus iniciációs szignálok is alkalmazhatók; ezek közé tartozik az ATG kezdőkodon és szomszédos szekvenciák. Ha a polipeptidet kódoló szekvenciákat, a kezdőkodont és az 5' -irányban lévő szekvenciákat megfelelő expressziós vektorba inszertáljuk, nincs szükség további transzk-

ripciós vagy transláció szabályozószekvenciákra, ha azonban csak a kódolószekvenciát (vagy annak egy részét) inszertáljuk a vektorba, exogén translációs szabályozószignálok (pl. ATG kezdőkodon) beiktatására van szükség. Ezen túlmenően, a teljes inszertált szekvencia translációjának biztosításához a kezdőkodonnak a kódolószekvenciával azonos leolvasási fázisban kell lennie. Az exogén translációs elemek és kezdőkodonok természetes vagy szintetikus eredetűek egyaránt lehetnek. Az expresszió hatékonysága olyan erősítőszekvenciák alkalmazásával fokozható, amelyek az adott sejtszisztem számára megfelelőek [ld. pl. Scharf és mtsai.: Results Probl. Cell Differ. 20, 125 (1994)].

A gazdasejt-törzset az inszertált szekvenciák expresszióját módosító képessége vagy az expresszált protein érését kívánt módon végrehajtó képessége alapján is kiválaszthatjuk. A polipeptidek módosításainak példái közé tartozik, többek között, az acetilálás, karboxilálás, glikozilálás, foszforilálás, lipidálás és acilezés. A protein pre-pro-alakját lehasító poszt-transzlációs érési folyamat szintén alkalmazható a megfelelő inszerció, hajtogatódás ("folding") és/vagy funkció elősegítésére. Az idegen protein pontos módosításának és érésének biztosítása érdekében olyan gazdasejtek választhatók ki (pl. CHO, COS, HeLa, MDCK, HEK293 és WI38), melyek a poszt-transzlációs aktivitások végrehajtásához specifikus celluláris gépezettel és sajátos mechanizmusokkal bírnak.

A rekombináns proteinek hosszú időtartamú, nagy hozamú termeltetésére általában előnyös a stabil expresszió alkalmazása. Például, egy adott polinukleotidot stabilan expresszáló sejtvonalakat virális eredetű replikációs kezdőhelyet és/vagy endogén expressziós elemeket és szelektálható markergént tartalmazó expressziós vektorral (vagy vektorokkal) transzformálhatunk. A vektor bejuttatását követően a sejteket dúsított tápközegben egy-két napig hagyhatjuk szaporodni, mielőtt áttérnénk a szelektív tápközegre. A szelektálható marker alkalmazásának célja a szelekciós nyomással szembeni rezisztencia kialakítása; a szelektálható marker jelenléte lehetővé teszi a bejuttatott szekvenciákat sikeresen expresszáló sejtek szaporítását és kinyerését. A stabilan transzformált sejtek rezisztens klónjai az adott sejtípushoz megfelelő szövettenyésztési technikák alkalmazásával szaporíthatók.

A transzformált sejtvonalak kinyerésére számos különféle szelekciós rendszer alkalmazható. Ezek példái közé tartozik, többek között, a herpes simplex vírus timidin kináz génje [Wigler és mtsai.: Cell 11, 223 (1977)] és adenin foszforiboziltranszferáz génje [Lowy és mtsai.: Cell 22, 817 (1990)], melyek tk.sup.-, illetve aprt.sup.- sejtekben alkalmazhatók. A szelekció antimetabolit-, antibiotikum- vagy herbicid-rezisztencia alapján is végrehajtható, például, a dhfr-gén a metotrexáttal szemben [Wigler és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 3567

(1980); az npt-gén az aminoglikozidokkal, neomicinnel és G-418-cal szemben [Colbere-Garapin és mtsai.: J. Mol. Biol. 150, 1 (1981)], míg az als- és pat-gén a klórszulfuronnal, illetve foszfinotricin acetiltranszferázzal szemben nyújt rezisztenciát (Murry, ld. fentebb). További szelektálható géneket is leírtak, mint pl. a trpB, amely a sejtek számára lehetővé teszi a triptofán helyett az indol felhasználását, valamint a hisD, amely hisztidin helyett hisztinolfelhasználást tesz lehetővé [Hartman és Mulligan: Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 8047 (1988)]. A látható markerek alkalmazása nagy népszerűséget szerzett az olyan markereknek, mint az antocianinok, béta-glükuronidáz és szubsztrátja, a GUS, a luciferáz és szubsztrátja, a luciferin, melyek nem csupán transzformánsok azonosítására, de a specifikus vektor-rendszereknek tulajdonítható - átmeneti vagy stabil - protein-termelés mennyiségi meghatározására is alkalmazhatók [Rhodes és mtsai.: Methods Mol. Biol. 55, 121 (1995)].

Bár a markergén expressziójának jelenléte vagy hiánya jelzést nyújt arra vonatkozólag, hogy a kérdéses gén szintén jelen van-e, a markergén jelenlétének vagy expressziójának igazolása nem feltétlenül szükséges. Például, ha a markergén szekvenciájába egy polipeptidet kódoló szekvenciát inszertálunk, a szekvenciákat tartalmazó rekombináns sejtek a markergén funkciójának hiánya alapján azonosíthatók. Más módon, a markergént egy polipeptidet kódoló szekvenciához tandem elhelyezkedésben, közös promóter szabályozása alá helyezhetünk; ilyen esetben a markergén szelekció hatására bekövetkező expressziója rendszerint egyúttal a tandem gén expresszióját is jelzi.

Más lehetőség szerint, egy kívánt polinukleotid-szekvenciát tartalmazó és expresszáló gazdasejtek szakember számára jól ismert eljárásokkal is azonosíthatók, melyek példái közé tartoznak, többek között, a DNS-DNS vagy DNS-RNS hibridizációk és a protein-biotesztek vagy immunesztek, melyek nukleinsav vagy protein detektálására és/vagy mennyiségi meghatározására alkalmas membrán-, oldat- vagy chip-alapú technológiákat foglalnak magukban.

A kívánt polinukleotid-szekvenciával transzformált gazdasejteket olyan feltételek mellett tenyésztjük, amelyek alkalmasak a proteinek sejtenyészetből történő kivonására. A rekombináns sejt az általa termelt proteint - az alkalmazott szekvenciától és/vagy vektortól függően - a tápközegbe kiválasztja vagy intracellulárisan felhalmozza. Ahogy az szakember számára jól ismert, a találmány szerinti polinukleotidokat tartalmazó expressziós vektorok úgy alakíthatók ki, hogy a kódolt polipeptid - prokarióta vagy eukarióta sejtmembránon keresztüli szekrécióját vezérlő szignálszekvenciákat is tartalmazzanak. Más rekombináns konstrukciók a kívánt polipeptidet kódoló szekvenciák olyan polipeptid-domént kódoló nukleotidszekvenciához történő kapcsolására alkalmazhatók, melyek elősegítik az oldékony proteinek tisztítását.

Az ilyen tisztítást elősegítő domének közé tartoznak, többek között, a fémkelátképző peptidek, mint pl. a hisztidin-triptofán modulok, melyek immobilizált fémeken történő tisztítást tesznek lehetővé; az immobilizált immunglobulinon végzett tisztítást elősegítő protein-A-domének, valamint a FLAGS extenziós/affinitási tisztítási rendszerben alkalmazott domén (Immunex Corp.,
 5 Seattle, Washington). A tisztítást elősegítő domén és a kódolt polipeptid közé hasítható kapcsolószekvenciákat beépítve szintén elősegíthető a polipeptid tisztítása. Az egyik ilyen expressziós vektor egy kívánt polipeptidet és - tioredoxinos vagy enterokinázos hasítási hely előtt - hat hisztidint kódoló nukleinsavat tartalmazó fúziós protein expresszálatását teszi lehetővé. A hisztidinek immobilizált fémion-affinitási kromatográfiával (IMIAc) történő tisztítást tesznek lehetővé [ld. Porath és mtsai.: Prot. Exp. Purif. 3, 263 (1992)], míg az
 10 enterokinázos hasítási hely lehetővé teszi a kívánt polipeptid fúziós proteinből történő tisztítását. A fúziós proteineket kódoló szekvenciákat tartalmazó vektorok leírását illetően ld. Kroll és mtsai.: DNA Cell Biol. 12, 441 (1993)].

A találmány szerinti polipeptidek és fragmensek a rekombináns módszereken kívül
 15 közvetlen, szilárd fázisú peptidszintézissel is előállíthatók [ld. Merrifield: J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 (1963)]. A proteinszintézis manuális vagy automatizált technikák alkalmazásával egyaránt elvégezhető. Az automatizált szintézist, például, Applied Biosystems 431A típusú peptidszintetizáló készülék (Perkin Elmer) alkalmazásával valósíthatjuk meg. Más módon, az egyes fragmenseket kémiai úton, külön-külön szintetizálhatjuk, majd a teljes molekulát a
 20 fragmensek kémiai eljárásokkal végzett kombinálásával hozzuk létre.

T-sejtek

A találmány egy következő szempontjának megfelelően T-sejteket tárunk fel, amelyek találmány szerinti tumorpolipeptidre (vagy változatára vagy származékára) specifikusak. Az ilyen sejtek általában szokványos módszerekkel, *in vitro* vagy *ex vivo* állíthatók elő. A T-sejtek, például, csontvelőből, perifériás vérből vagy egy páciens csontvelőjének vagy perifériás
 25 vérének frakciójából, kereskedelmi forgalomban beszerezhető elválasztórendszer [pl. Izolex™; Nexell therapeutics, Inc. (Irvine, CA, USA)] alkalmazásával izolálható (ld. az 5 240 856 és 5 215 926 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat, valamint a WO 89/06280, WO 91/16116 és WO 92/07243 számú nemzetközi közzétételi iratokat). Más módon, a T-sejtek
 30 egymással rokonságban álló vagy nem rokon emberekből, nem humán emlősokból, sejtvonalakból vagy sejtenyészetekből is származtathatók.

A T-sejtek polipeptiddel, polipeptidet kódoló polinukleotid-szekvenciával és/vagy ilyen polipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejtrel stimulálhatók. A stimulációt az adott

polipeptidre specifikus T-sejtek kialakulásának megfelelő feltételek mellett és ideig végezzük. A találmány szerinti tumorpholipeptidet vagy az azt kódoló polinukleotidot - a specifikus T-sejtek létrehozása céljából - előnyösen hordozóban (pl. mikrogömbökben) helyezzük el.

A T-sejtek akkor mondhatók egy találmány szerinti polipeptidre specifikusnak, ha a

5 T-sejtek a polipeptiddel bevont (vagy a polipeptidet kódoló gént expresszáló) célsejtek jelenlétében specifikusan proliferálnak, citokineket szekretálnak vagy elpusztítják e célsejteket. A T-sejt-specifitás standard technikák alkalmazásával értékelhető. Például, krómfelszabadulási tesztben vagy proliferációs tesztben a lízis és/vagy proliferáció - negatív kontrollhoz viszonyítva - kétszeresnél nagyobb mértékű fokozásának megfelelő stimulációs index T-sejt-specifitást

10 jelez. Az ilyen tesztek, például, Chen és mtsai. [Cancer Res. 54, 1065 (1994)] leírása szerint hajthatók végre. Más módon, a T-sejtek proliferációjának kimutatására számos ismert technika alkalmazható. Például, a T-sejt-proliferációt a megnövekedett mértékű DNS-szintézis mérésével detektálhatjuk (pl. T-sejtek tenyészetét impulzuszerűen ^3H -timidinnel jelöljük, majd mérjük a DNS-be beépült ^3H -timidin mennyiségét. Egy tumorpholipeptiddel (100 ng/ml és 100

15 $\mu\text{g/ml}$ közötti, előnyösen 200 ng/ml és 25 $\mu\text{g/ml}$ közötti koncentrációban) 3-7 napig végzett érintkeztetés a T-sejt-proliferációt általában legalább kétszeresére növeli. Hasonló feltételekkel végzett 2-3 órás érintkeztetés - standard citokin-teszttel végzett meghatározás szerint, amelyben a citokin-felszabadulás (pl. TNF- vagy IFN- γ -felszabadulás) kétszeres mértékű fokozódása T-sejt-aktiválásra utal [ld. Coligan és mtsai.: "Current Protocols in Immunology", 1. kötet,

20 Wiley Interscience, Greene (1998)] a T-sejtek aktiválását eredményezi. A tumorpholipeptiddel, -polinukleotiddal vagy tumorpholipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejttel végzett érintkeztetés hatására aktiválódott T-sejtek CD4^+ -ak és/vagy CD8^+ -ak lehetnek. A tumorpholipeptidre specifikus T-sejtek szokványos módszerekkel szaporíthatók. A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a T-sejteket a páciensből, vele rokon donorból vagy rokonságban nem

25 álló donorból gyűjtjük, és stimulációt és szaporítást követően adjuk be a páciensnek.

Terápiás célokra a tumorpholipeptid, tumorpholinkleotid vagy antigénprezentáló sejt hatására proliferálódó CD4^+ vagy CD8^+ T-sejtek *in vitro* vagy *in vivo* szaporíthatók. Az ilyen T-sejtek *in vitro* szaporítását számos különféle módon végezhetjük. Például, a T-sejteket ismételt tumorpholipeptiddel - vagy annak immunogén részletének megfelelő rövid peptiddel -

30 érintkeztethetjük (T-sejt növekedési faktorok, pl. interleukin-2 és/vagy a tumorpholipeptidet termelő stimulátor sejt hozzáadásával vagy anélkül). Más módon, a tumorpholipeptid jelenlétében proliferálódó egy vagy több T-sejteket klónozással szaporíthatjuk. A sejtek klónozási technikái szakember számára jól ismertek (pl. limitáló hígítás).

Gyógyászati készítmények

A találmány további megvalósítási módjai értelmében olyan készítményeket tárunk fel, amelyek gyógyászati szempontból elfogadható hordozóban egy vagy több találmány szerinti polinukleotidot, polipeptidet, T-sejtet és/vagy antitestet tartalmaznak, és amelyek - önmagukban vagy egy vagy több egyéb készítménnyel együtt - sejtbe vagy állatba juttathatók be. Közlebből, gyógyászati készítmények tumorok kezelésére történő alkalmazását tárjuk fel, mely készítmények találmány szerinti cripto-polinukleotidokat, cripto-polipeptideket, ezek fragmen-
seit, változatait és fúziós konstrukcióit tartalmazzák. A találmány szerinti gyógyászati készítmények cripto-polipeptidként előnyösen cripto-1-polipeptidet tartalmaznak.

10 A találmány szerinti készítmények, kívánt esetben, egyéb hatóanyagokkal - például, egyéb proteinekkal vagy polipeptidekkel vagy különböző, gyógyászatilag aktív hatóanyaggal - kombinálva adagolhatók. A kombinálva alkalmazható egyéb komponensekkel szemben nincs különösebb kikötés, feltéve, hogy a célsejtekkel vagy -szövetekkel érintkezve nem okoznak zavaró mellékhatásokat. Ennek megfelelően, a készítmények különféle - az adott esetnek
15 megfelelő - egyéb hatóanyagokkal együtt adagolhatók. Az ilyen készítmények gazdasejtekből vagy egyéb biológiai forrásokból tisztíthatók, vagy más módon, az itt leírtak szerint kémiai módszerekkel szintetizálhatók. Hasonlóan, a találmány szerinti készítmények szubsztituált vagy derivatizált RNS-t vagy DNS-t is tartalmazhatnak.

Ennek megfelelően, a találmány egy következő szempontja értelmében gyógyászati
20 készítményeket tárunk fel, amelyek egy vagy több találmány szerinti polinukleotidot, polipeptidet, antitestet és/vagy T-sejt-készítményt fiziológiailag elfogadható hordozóval együtt tartalmaznak. A találmány bizonyos előnyös megvalósítási módjai szerint a találmány szerinti gyógyászati készítmények találmány szerinti immunogén polinukleotidot és/vagy immunogén polipeptidet tartalmaznak, és profilaktikus és terápiás vakcinaként alkalmazhatók. A vakcinák
25 előállításának általános leírását illetően ld. pl. Powell és Newman (szerk.): "Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach)", Plenum Press, NY (1995). Az ilyen készítmények általában egy vagy több találmány szerinti polinukleotidot és/vagy polipeptidet egy vagy több immunstimulátorral kombinálva tartalmaznak.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények a találmány szerinti polinukleotidok és
30 polipeptidek gyógyászati szempontból elfogadható sóit is tartalmazhatják. Az ilyen sók, például, gyógyászati szempontból elfogadható, nem toxikus szerves bázisokból (pl. primer, szekunder és tercier aminosavakból és bázikus aminosavakból) és szervetlen bázisokból állíthatók elő (pl. nátrium-, kálium-, lítium-, ammónium-, kalcium- és magnéziumsók).

A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti immunogén készítmények (pl. vakcinakészítmények) egy vagy több találmány szerinti polipeptidet kódoló DNS-t tartalmaznak, miáltal a polipeptid *in situ* termelődik. Ahogy fentebb említettük, a polinukleotid bejuttatására szakember számára jól ismert célbajuttató-rendszerek alkalmazhatók. A génbejuttatási technikák leírását illetően ld. pl. Rolland: Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15, 143 (1998), valamint az ott felsorolt hivatkozásokat. A találmány céljaira alkalmas polinukleotid-expressziós rendszerek, természetesen, magukban foglalják a páciensben történő expresszáltatáshoz szükséges szabályozószekvenciákat (pl. promótert és terminációs szignálszekvenciát). Más módon, bakteriális célbajuttató rendszerek alkalmazása-
kor olyan baktériumot adunk be (pl. *Bacillus-Calmette-Guerin*), amely a polipeptid immunogén részletét felületén expresszálja vagy ilyen epitópot szekretál.

Mindezeknek megfelelően, a találmány bizonyos megvalósítási módjai értelmében, a találmány szerinti immunogén polipeptideket kódoló polinukleotidok expresszáltatás céljából az ismert vírusalapú rendszerek bármelyikének alkalmazásával bejuttathatók a megfelelő em-
lőseredetű gazdasejtekbe. A találmány szerinti polipeptidet kódoló nukleotidszekvenciát vek-
torba inszertálhatjuk, és szakember számára jól ismert módszerekkel retrovírus-részecskékbe csomagolhatjuk. Ezt követően a rekombináns vírust izoláljuk, majd bejuttatjuk a páciensbe. Az idevonatkozó szakirodalomban számos jellemző retrovírus-rendszer ismeretes [ld. pl. 5 219 740 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Miller és Rosman: BioTechniques 7, 980 (1989); Miller: Human Gene Therapy 1, 5 (1990); Scarpa és mtsai.: Virology 180, 849 (1991); Burns és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8033 (1993); és Boris-Lawrie és Temin: Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102 (1993)].

Ezen túlmenően, számos adenovírus-alapú rendszert is feltártak. Az adenovírusok -
ellentétben a gazdasejt genomjába integrálódó retrovírusoktól - extrakromoszómális állapotban
maradnak, ami minimálisra csökkenti az inszerciós mutagenézissel összefüggő kockázatot
[Haj-Ahmad és Graham: J. Virol. 57, 267 (1986); Bett és mtsai.: J. Virol. 67, 5911 (1993); Mittereder és mtsai.: Human Gene Therapy 5, 717 (1994); Seth és mtsai.: J. Virol. 68, 933 (1994); Barr és mtsai.: Gene Therapy 1, 51 (1994); Berkner: BioTechniques 6, 616 (1988); Rich és mtsai.: Human Gene Therapy 4, 461 (1993)].

A polinukleotidok célbajuttatására különféle adeno-asszociált vírus (AAV) vektor-
rendszereket is kifejlesztettek. Az AAV-vektorok szakember számára jól ismert technikák al-
kalmazásával egyszerűen létrehozhatók [ld. pl. az 5 173 414 és 5 139 941 számú egyesült ál-
lamokbeli szabadalmi leírásokat és a WO 92/01070 és WO 93/03769 számú nemzetközi köz-

zéteteli iratokat; valamint Lebkowski és mtsai.: Molec. Cell. Biol. 8, 3988 (1988); Vincent és mtsai.: Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990); Carter: Current Opinion in Biotechnology 3, 533 (1992); Muzyczka: Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158, 97 (1992); Kotin: Human Gene Therapy 5, 793 (1994); Shelling és Smith: Gene Therapy 1, 165 (1994); Zhou és mtsai.: J. Exp. Med. 179, 1867 (1994)].

A találmány szerinti polipeptideket kódoló polinukleotidok célbajuttatására alkalmas, további virális vektorok közé tartoznak a himlővírusokból (pl. vaccinia vírustól és madárhimlő vírustól) származók. Például, a találmány szerinti polinukleotidokat expresszáló rekombináns vaccinia vírusok a következők szerint állíthatók elő. A polipeptidet kódoló DNS-t először megfelelő vektorba - vaccinia-promóterrel és szegélyező vaccinia-DNS-szekvenciákkal (pl. a timidin kinázt kódoló szekvenciával) szomszédos pozíciókba - inszertáljuk, majd a kapott vektorral olyan sejteket transzfektálunk, melyeket egyidejűleg vaccinia vírussal fertőztünk. A vaccinia-promóter és a kérdéses polipeptidet kódoló gén vírusgenomba történő inszertálására homológ rekombináció szolgál. Az így kapott TK.sup.(-) rekombináns a sejtek 5-bróm-dezoxiuridin jelenlétében végzett tenyésztésével és az arra rezisztens vírus-plakkok összeszedésével szelektálható.

A vaccinia-alapú infekciós/transzfekciós rendszer előnyösen alkalmazható egy vagy több találmány szerinti polipeptid indukálható, átmeneti termeltetésére vagy együttes termeltetésére organizmusból származó gazdasejtekben. E rendszerben a sejteket először *in vitro* - T7-RNS-polimerázt kódoló - rekombináns vaccinia vírussal fertőzzük. Ez a polimeráz kizárólagos specifitással bír, azaz csak T7-promótereket hordozó templátok transzkriptálására képes. A fertőzés után a sejteket a kívánt polinukleotiddal vagy polinukleotidokkal transzfektáljuk (T7-promóter szabályozása mellett), majd a rekombináns vaccinia vírus által a citoplazmában expresszált polimeráz a transzfektált DNS-t RNS-sé írja át, amely azután - a gazdasejt transzlációs gépezetének felhasználásával - polipeptiddé transzlálódik. Ez az eljárás nagy mennyiségű RNS (és transzlációs terméke) átmeneti, citoplazmikus termelődését eredményezi [ld. pl. Elroy-Stein és Moss: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6743 (1990); Fuerst és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122 (1986)].

Más lehetőség szerint, a kívánt kódolószekvenciák célbajuttatására avipox (madárhimlő) vírusok (pl. baromfihimlő és kanárihimlő vírusok) is alkalmazható. Az emlőspatogének-
ből származó immunogéneket expresszáló, rekombináns avipox vírusokról ismeretes, hogy
emlősöknek adagolva védő hatású immunitás kialakítására alkalmasak. Az Avipox-vektor al-
kalmazása emberek és egyéb emlősfajok esetében különösen előnyös, mivel az Avipox nemzet-

ség tagjai csak fogékony madárfajokban képesek produktív replikációra, így emlőssejtekben nem fertőzőképesek. A rekombináns avipox vírusok előállításai szakember számára jól ismertek, és genetikai rekombináción alapulnak, ahogy azt a vaccinia vírusok előállításával összefüggésben fentebb leírtuk (ld. pl. a WO 91/12882, WO 89/03429 és WO 92/03545 számú nemzetközi közzétételi iratokat).

A találmány szerinti polinukleotidok sejtekbe történő bejuttatására a számos alfavírus-vektor bármelyike is alkalmazható (ld. pl. az 5 843 723, 6 015 686, 6 008 035 és 6 015 694 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat). A venezuelai ló encephalitis (VEE) víruson alapuló bizonyos vektorok is alkalmasak lehetnek (jellemző példákat illetően ld. az 5 509 947 és 5 643 576 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat).

Ezen túlmenően, a találmány szerinti megoldás értelmében a gének célbajuttatására molekuláris konjugátum vektorok is alkalmazhatók, mint pl. a kiméra adenovírus-vektorok [ld. Michael és mtsai.: J. Biol. Chem. 268, 6866 (1993); és Wagner és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6099 (1992)].

A fentebb említett és egyéb ismert, vírusalapú célbajuttató rendszerek leírását illetően ld. a következő forrásokat: Fisher-Hoch és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 317 (1989); Flexner és mtsai.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 569, 86 (1989); Flexner és mtsai.: Vaccine 8, 17 (1990); 4 603 112, 4 769 330, 5 017 487 és 4 777 127 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás; WO 89/01973 és WO 91/02805 számú nemzetközi közzétételi irat; GB 2 200 651 számú nagy-britanniai szabadalmi leírás; EP 0 345 242 számú európai szabadalmi leírás; Berkner: BioTechniques 6, 616 (1988); Rosenfeld és mtsai.: Science 252, 431 (1991); Kolls és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 215 (1994); Kass-Eisler és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11498 (1993); Guzman és mtsai.: Circulation 88, 2838 (1993); és Guzman és mtsai.: Cir. Res. 73, 1202 (1993).

A találmány egy további megvalósítási módja értelmében a polinukleotidot "csupasz" DNS-ként juttatjuk be, ill. adagoljuk [ld. pl. Ulmer és mtsai.: Science 259, 1745 (1993); illetve Cohen: Science 259, 1691 (1993)]. A csupasz DNS sejtek általi felvételét oly módon fokozhatjuk, hogy a DNS-t biológiailag lebontható - a sejtekbe hatékonyan bejuttatható - szemcsékre vesszük fel.

A találmány egy következő megvalósítási módja szerint a találmány szerinti készítményt részecskebombázási technikával juttathatjuk be a sejtekbe. Az egyik jellemző példa értelmében gázzal hajtott részecskegyorsítást alkalmazhatunk, például, a Powderject Pharamceuticals PLC (Oxford, Egyesült Királyság) és a Powderject Vaccines, Inc. (Madison,

WI, USA) által gyártott készülékek felhasználásával (néhány példát illetően ld. az 5 846 796, 6 010 478, 5 865 796 és 5 584 807 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat és a 0 500 799 számú európai szabadalmi leírást). Ez a megoldás tú alkalmazása nélküli bejuttatási módszert tesz lehetővé, melynek során kézi eszközzel létrehozott héliumgáz-árammal mikroszkopikus szemcsékből (pl. polinukleotid- vagy polipeptid-szemcsékből) álló száraz port nagy sebességre gyorsítunk fel, ami a szemcséket a célszövetbe juttatja. Nukleinsav bejuttatására előnyösen 0,4-4,0 µm, még előnyösebben 0,6-2,0 µm átmérőjű arany szemcséket alkalmazhatunk, és azokat a DNS-konjugátummal bevonva "génagyúba" helyezhető töltetekbe helyezzük. A szemcséket általában és előnyösen bőrbe juttathatjuk be. A bőrbe történő célbajuttatás egyéb módjai közé tartozik a folyadékkészítmények tú alkalmazásával végzett injektálása.

A DNS-vakcinák rendszerint olyan bakteriális plazmidvektort tartalmaznak, amelybe erős - jellemzően virális - promóter, az antigénhatású peptidet kódoló gén, valamint poliadenilációs szignál és transzkripció terminációs szekvencia van inszertálva. A plazmidvektor a szóban forgó génként találmány szerinti, teljes hosszúságú cripto-proteint vagy a 13-94. azonosítószámú szekvenciákként bemutatott antigénhatású peptidek valamelyikét kódoló gént tartalmazhat. A plazmid baktériumokban (pl. *E. coli*-ban) szaporítható, majd (a tervezett adagolási módtól függően), a gazdának történő beadás előtt megfelelő tápközegben izolálható és termeltethető. A beadást követően a plazmidot a gazdaszervezet sejtjei felveszik, és a plazmidban lévő gén által kódolt peptid a sejtekben termelődik. A plazmidvektort előnyösen - az emlős gazdaszervezetben történő plazmidreplikáció és a gazda kromoszómális DNS-ébe történő integrálódás elkerülése érdekében - eukarióta sejtekben működőképes replikációs kezdőhely nélkül állítjuk elő.

A DNS-vakcinák alkalmazása a hagyományos vakcinálási technikákkal szemben számos előnnyel biztosít. Először is, megjósolható, hogy - mivel a DNS-szekvencia által kódolt proteinek a gazdaszervezet sejtjeiben szintetizálódnak - a protein szerkezete és konformációja hasonló lesz a betegséggel összefüggő natív proteinéhez. Szintén valószínű, hogy a DNS-vakcinálás egy vírus különböző törzseivel szemben nyújt védettséget, azáltal, hogy konzervált proteinekből származó epitópokat felismerő citotoxikus T-limfocita reakciókat vált ki. Ezen túlmenően, mivel a plazmidokat azok a gazdasejtek veszik fel, amelyekben antigénhatású protein termelődhet, hosszú időtartamú immunreakció váltható ki. Ez a technológia lehetőséget nyújt különböző immunogének/epitópok egyetlen készítményben történő kombinálására.

A DNS-vakcinálással kapcsolatos, hasznos alapinformációk leírását illetően ld. Donnelly és mtsai.: "DNA vaccines", Ann. Rev. Immunol. 15, 617 (1997), mely forrást teljes

terjedelmében a kitanítás részének tekintünk.

A találmány egy előzővel összefüggő megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti készítmények túmentes, gázhajtású injektálására alkalmas készülékek közé tartoznak a Bioject, Inc. (Protland, OR, USA) által gyártott berendezések (ld. a 4 790 824, 5 064 413, 5 312 335, 5 383 851, 5 399 163, 5 520 639 és 5 993 412 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat).

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint a találmány szerinti gyógyászati készítmények - a találmány szerinti immunogén polinukleotidon, polipeptiden, antitesten, T-sejten és/vagy antigénprezentáló sejten kívül - egy vagy több immunstimulátort is tartalmaznak.

Az "immunstimulátor" kifejezésen exogén antigénre adott (antitestes és/vagy sejtközvetítette) immunreakciót elősegítő vagy lehetővé tevő anyagot értünk. Az immunstimulátorok egyik előnyös típusa az adjuváns. Számos adjuváns tartalmaz olyan anyagot, amelynek feladata, hogy megvédje az antigént a gyors lebomlástól (pl. alumínium-hidroxid vagy ásványi olajok), illetve, hogy stimulálja az immunreakciókat (pl. lipid-A, *Bordatella pertussis* vagy *Mycobacterium tuberculosis* proteinjei). Bizonyos adjuvánsok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők, mint pl. a Freund-féle komplett és inkomplett adjuváns (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA); Merck Adjuvant-65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ, USA); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA, USA); alumíniumsók, pl. alumínium-hidroxid gél (alum) vagy alumínium-foszfát; kalcium-, vas- és cinksók; acilezett tirozin oldhatatlan szuszpenziója; acilezett cukrok; kationos vagy anionos módon derivatizált poliszacharidok; polifoszfazének; biológiai-
lag lebontható mikrogömbök; monofoszforil-lipid-A és quil-A. Adjuvánsként alkalmazhatók citokinek, pl. GM-CSF, interleukin-2, IL-7, IL-12 és egyéb hasonló növekedési hormonok is.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint előnyösen olyan adjuvánst alkalmazunk, amely elsősorban Th1-típusú immunreakciót indukál. A Th1-típusú citokinek (pl. IFN- γ , TNF α , IL-2 és IL-12) nagy mennyisége a beadott antigén elleni sejtközvetítette immunreakciók indukálásának kedvez. Ezzel szemben, a Th2-típusú citokinek (pl. IL-4, IL-5, IL-6 és IL-10) nagy mennyisége a humorális immunreakciók indukálásának kedvez. Egy találmány szerinti vakcina beadását követően a páciensben Th1- és Th2-típusú immunreakciók indukálódnak. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint (amikor is a reakció elsősorban Th1-típusú), a Th1-típusú citokinek koncentrációja nagyobb mértékben nő, mint a Th2-típusú citokineké. E citokinek koncentrációja standard tesztekkel egyszerűen mérhető [a citokincsaládok áttekintését ld. Mosmann és Coffman: Ann. Rev. Immunol. 7, 145 (1989)].

Az elsősorban Th1-típusú reakció kiváltására alkalmas adjuvánsok közé tartozik, például, egy monofoszforil-lipid-A (előnyösen 3-de-O-acilezett monofoszforil-lipid-A) alumínium-sóval alkotott kombinációja. Az MPL® adjuvánsok kereskedelmi forgalomban a Corixa Corporation-től (Seattle, WA, USA) szerezhetők be (ld. pl. a 4 436 727, 4 877 611, 4 866 034 és 4 912 094 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat). A CpG-tartalmú oligonukleotidok (menyekben a CpG-dinukleotid nem metilált) szintén döntően Th1-reakciót indukálnak. Az ilyen oligonukleotidok jól ismertek (ld. pl. a WO 96/02555 és WO 99/33488 számú nemzetközi közzétételi iratokat és a 6 008 200 és 5 856 462 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat). A szakirodalomban immunstimulátor DNS-szekvenciákat is leírtak [ld. pl. Sato és mtsai.: Science 273, 352 (1996)]. Egy másik előnyös adjuváns szaponint tartalmaz, pl. Quil-A-t vagy származékait (mint pl. a QS21 és QS7; Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA, USA), escint, digitonint vagy *Gypsophila* vagy *Chenopodium quinoa* szaponint. Más előnyös készítmények adjuvánsként több szaponin kombinációját tartalmazzák; például, a következők közül legalább kettő kombinációját: QS21, QS7, Quil-A, β -escin és digitonin.

Más módon, a szaponinok olyan vakcinahordozókkal kombinálhatók, amelyek kitozánból vagy egyéb polikationos polimerekből, polilaktid és polilaktid-ko-glikolid szemcsékből, poli-N-acetil-glükózamin-alapú polimerből, poliszacharidokból vagy kémiaiilag módosított poliszacharidokból álló szemcsékből, liposzómákból és lipidalapú szemcsékből, glicerín-monoészter szemcsékből és hasonlókból állnak. A szaponinok koleszterin jelenlétében is készítménybe foglalhatók, ami szemcsés struktúrát eredményez (pl. liposzómák és ISCOM-ok). Ezen túlmenően, a szaponinok készítményei polioxietilén-éterrel vagy -észterrel is előállíthatók, akár oldat vagy szuszpenzió, akár szemcsés alakban (pl. kevéslamellás liposzóma vagy ISCOM alakjában). A szaponinok a viszkozitás fokozása céljából olyan segédanyagokkal kombinálhatók, mint pl. a Carbopol®, illetve (segédanyagként pl. laktóz alkalmazásával) száraz porként is előállíthatók.

Az egyik előnyös megvalósítási mód szerint az adjuvánsrendszer monofoszforil-lipid-A és egy szaponinszármazék - pl. QS21 és 3D-MPL® adjuváns - kombinációját (ld. WO 94/00153 számú nemzetközi közzétételi irat), vagy kevésbé reaktogén készítményt tartalmaz, amelyben a QS21 koleszterinnel van csillapítva (ld. WO 96/33739 számú nemzetközi közzétételi irat). Más előnyös készítmények "olaj a vízben" típusú emulziókat és tokoferolt tartalmaznak. Egy másik, különösen előnyös adjuvánskészítmény olaj a vízben emulzióban QS21-et, 3D-MPL® adjuvánsot és tokoferolt tartalmaz (ld. WO 95/17210 számú nemzetközi közzétételi irat).

Egy további, javított adjuvánsrendszer CpG-tartalmú oligonukleotid és szaponinszármazék kombinációját tartalmazza, pl. CpG és QS21 kombinációját (ld. WO 00/09159 számú nemzetközi közzétételi irat). A készítmény előnyösen tartalmaz olaj a vízben emulziót és tokoferolt is.

5 A találmány szerinti gyógyászati készítményekben alkalmazható egyéb adjuvánsok közé tartoznak a következők: Montanide ISA 720 (Seppic, Franciaország), SAF (Chiron, Kalifornia, USA), ISCOM-ok (CSL), MF-59 (Chiron), SBAS adjuváns-sorozat (pl. SBAS-2 vagy SBAS-4; SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium), Detox (Enhancyn®; Corixa, Hamilton, MT, USA), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT, USA) és egyéb amino-alkil-glükózamidin-4-
10 foszfátok (AGP-k), mint például, az elbírálás alatt álló 08/853 826 és 09/074 720 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésekben leírtak (mely forrásokat teljes terjedelmükben a kitanítás részének tekintjük), valamint a polioxietilén-éter adjuvánsok (ld. pl. WO 99/52549A1).

További előnyösen alkalmazható adjuvánsok közé tartoznak az (I) általános képletű
15 adjuvánsmolekulák:



ahol "n" értéke: 1-től 50-ig terjedő egész szám; "A" jelentése: kémiai kötés vagy -C(O)- csoport; "R" jelentése: 1-50 szénatomos alkilcsoport vagy fenil-(C₁₋₅₀-alkil)csoport.

A találmány egyik megvalósítási módja értelmében olyan vakcinakészítményt tárunk
20 fel, amely (I) általános képletű polioxietilén-étert tartalmaz, mely képletben "n" értéke: 1-50, előnyösen 4-24, legelőnyösebben 9; "R" jelentése 1-50 szénatomos alkilcsoport, előnyösen 4-20 szénatomos alkilcsoport, legelőnyösebben 12 szénatomos alkilcsoport; és "A" jelentése: kémiai kötés. A vakcinakészítmény a polioxietilén-étereket 0,1-20 %, előnyösen 0,1-10 %, legelőnyösebben 0,1-1 % koncentrációban tartalmazza. Az előnyös polioxietilén-éterek a következők: polioxietilén-9-lauril-éter, polioxietilén-9-szteoril-éter, polioxietilén-8-szteoril-éter, polioxietilén-9-lauril-éter, polioxietilén-9-szteoril-éter, polioxietilén-8-szteoril-éter, polioxietilén-4-lauril-éter, polioxietilén-35-lauril-éter és polioxietilén-23-lauril-éter. A polioxietilén-éterek, pl. polioxietilén-lauril-éter, leírását illetően ld. a Merck indexet (12. kiadás, 7717-es bejegyzés). A felsorolt adjuvánsmolekulákat a WO 99/52549 számú nemzetközi közzétételi
25 iratban tárták fel.
30

Az (I) általános képletű polioxietilén-éter, kívánt esetben, másik adjuvánssal is kombinálható. Egy előnyös adjuváns-kombináció az (I) általános képletű polioxietilén-éter és a CpG kombinációja (ld. az elbírálás alatt álló GB 9820956.2 számú nagy-britanniai szabadalmi beje-

lentést).

A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti immunogén készítményt antigénprezentáló sejtek (pl. dendritikus sejtek, makrofágok, B-sejtek, monociták és egyéb, az antigénprezentálás hatékonyságának növelése érdekében manipulált
5 sejtek) alkalmazásával juttatjuk be a gazdába. Az ilyen sejtek - bár nem szükségszerűen - az antigénprezentálási képesség fokozása, a T-sejt-reakció aktiválásának és/vagy fenntartásának javítása, tumorelles hatás kialakítása és/vagy a fogadóval immunológiai kompatibilitás (azaz egyeztetett HLA-haplotípus) létrehozása céljából genetikai módosításoknak vethetők alá. Az antigénprezentáló sejtek autológ, allogén, szingén vagy xenogén sejtek lehetnek, és általában
10 különféle biológiai folyadékokból és szervekből (ideértve a tumorszöveteket és a tumorkörnyéki szöveteket) izolálhatók.

A találmány bizonyos előnyös megvalósítási módjai értelmében antigénprezentáló sejt-ként dendritikus sejteket vagy azok őssejtjeit alkalmazzuk. A dendritikus sejtek igen hatékony antigénprezentáló sejtek [ld. Banchereau és Steinman: Nature 392, 245 (1998)], és
15 profilaktikus vagy terápiás tumorelles immunitás kiváltására hatékony fiziológiai adjuvánsnak bizonyultak [ld. Timerman és Levy: Ann. Rev. Med. 50, 507 (1999)]. A dendritikus sejtek általában jellegzetes alakjuk alapján [*in situ* csillag alakúak, *in vitro* látható citoplazmikus nyúlványokkal (dendritekkel)], antigéneket nagy hatékonysággal felvevő, feldolgozó és prezentáló képességük alapján, illetve natív T-sejt-reakciókat aktiváló képességük
20 alapján azonosíthatók. A dendritikus sejtek, természetesen, úgy módosíthatók, hogy olyan specifikus sejt-felületi receptorokat vagy ligandumokat expresszáljanak, amelyek normális esetben *in vivo* vagy *ex vivo* nem találhatók meg rajtuk. Az ilyen módosított dendritikus sejtek a találmány tárgyához tartoznak. A vakcinában - a dendritikus sejtek alternatívájaként - a dendritikus sejtek szekretált antigénnel töltött vezikulái (ún. exoszómák) is alkalmazhatók [ld. Zitvogel és
25 mtsai.: Nature Med. 4, 594 (1998)].

A dendritikus sejtek és őssejtjeik perifériás vérből, csontvelőből, tumorba infiltrálódó sejtekből, tumorkörnyéki szövetekbe infiltrálódó sejtekből, nyirokcsomókból, lépéből, bőrből, köldökzsinór-vérből vagy bármely alkalmas szövetből vagy testfolyadékból izolálhatók. Például, a dendritikus sejtek - perifériás vérből gyűjtött monociták tenyésztéséhez citokinek (pl. GM-CSF, IL-4, IL-13 és/vagy TNF α) kombinációjának hozzáadásával *ex vivo* differenciálthatók.
30 Más módon, a perifériás vérből, köldökzsinór-vérből vagy csontvelőből gyűjtött CD34-pozitív sejtek - tenyésztő tápközegükhöz GM-CSF, IL-3, TNF α , CD40-ligandum, LPS, flt3-ligandum és/vagy egyéb (a dendritikus sejtek differenciálódását, érését és proliferációját indukáló) ve-

gyület(ek) kombinációinak hozzáadásával - differenciálhatók dendritikus sejtekké.

A dendritikus sejtek éretlen vagy érett sejtekként kategorizálhatók, ami két jól körülírható fenotípus megkülönböztetésének egyszerű módját teszi lehetővé, azonban ez nem jelenti a köztes differenciációs stádiumok kizárását. Az éretlen dendritikus sejtek olyan antigénprezentáló sejtekként karakterizálhatók, amelyekre - Fc γ -receptor és mannóz-receptor nagy mennyiségben történő termelődésével összhangban - nagy antigénfelvételi és -feldolgozási képesség jellemző. Az érett fenotípusra rendszerint e markerek kisebb mértékű termelődése, de a T-sejt-aktiválásért felelős sejtfelületi molekulák - pl. MHC I. és II. osztályú adhéziós molekulák (pl. CD54 és CD11) és ko-stimulátor molekulák (pl. CD40, CD80, CD86 és 4-1BB) - nagy mennyiségű termelődése jellemző.

Az antigénprezentáló sejtek általában egy találmány szerinti polinukleotiddal (vagy részletével vagy egyéb változatával) oly módon transzfektálhatók, hogy a kódolt polipeptid (vagy immunogén részlete) a sejtek felületén expresszáldjon. Az ilyen transzfekció *ex vivo* hajtható végre, majd a transzfektált sejteket tartalmazó gyógyászati készítményt, az itt ismertetett módon, terápiás célokra alkalmazhatjuk. Más lehetőség szerint, a páciensnek - dendritikus sejtet vagy egyéb antigénprezentáló sejtet megcélzó - génbejuttató hordozót adhatunk be, miáltal a transzfekció *in vivo* játszódik le. A dendritikus sejtek *in vivo* és *ex vivo* transzfekcióját a szakember számára jól ismert eljárások bármelyikével végrehajthatjuk, így például, a WO 97/24447 számú nemzetközi közzétételi iratban leírt módszerekkel vagy a Mahvi és mtsai. [Immunology and Cell Biology 75, 456 (1997)] által leírt génágyú-technikával. A dendritikus sejtek antigénnel történő feltöltése érdekében a sejteket (vagy összejtjeiket) a tumorpoliipeptiddal, DNS-sel (csupaszon vagy plazmidvektorba inszertálva), RNS-sel - vagy antigént expresszálo rekombináns baktériummal vagy vírussal (pl. vaccinia vírussal, baromfihimlő vírussal, adenovírussal vagy lentivírussal) - inkubáljuk. A feltöltést megelőzően a polipeptidet kovalens kötéssel olyan immunológiai partnerhez (pl. hordozómolekulához) konjugáljuk, amely T-sejt-segítséget biztosít. Más módon, a dendritikus sejtet - a polipeptid jelenlétében vagy attól elkülönítve - impulzusszerűen a konjugátlan immunológiai partnerrel kezeljük.

Bár a találmány szerinti gyógyászati készítményekben az ismert, megfelelő hordozók bármelyike alkalmazható, a hordozó típusát rendszerint az adagolási módtól függően választjuk ki. A találmány szerinti készítmények tetszőleges adagolási módhoz alakíthatók ki, így pl. helyi, orális, nazális, nyálkahártyai, intravénás, intracranialis, intraperitoneális, szubkután és intramuszkuláris adagoláshoz.

A találmány szerinti gyógyászati készítményekben biokompatibilis és biológiailag lebontható hordozók alkalmazhatók. A találmány bizonyos megvalósítási módjaiban a készítmény az aktív komponens viszonylag állandó szintű felszabadulását biztosítja, más megvalósítási módok értelmében azonban (közvetlenül a beadást követően) gyorsabb hatóanyag-felszabadulásra van szükség. Az ilyen készítmények szakember számára jól ismert technikák alkalmazásával állíthatók elő. Az e tekintetben hasznos hordozók példái közé tartoznak a poli(laktid-ko-glikolid), poliakrilát, latex, keményítő, cellulóz, dextrán és hasonló anyagú mikroszemcsék. Az egyéb, késleltetett hatóanyag-felszabadulást biztosító hordozók példái közé tartoznak a szupramolekuláris biovektorok, amelyek nem folyékony hidrofil magból (pl. kereszt-kötéses poliszacharidból vagy oligoszacharidból), és, adott esetben, amphifil vegyületet (pl. foszfolipidet) tartalmazó külső rétegből állnak (ld. pl. az 5 151 254 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást és a WO 94/20078, WO 94/23701 és WO 96/06638 számú nemzetközi közzétételi iratokat). A tartós hatóanyag-felszabadulást biztosító készítményekben lévő aktív hatóanyag mennyisége az implantáció helyétől, a felszabadulás sebességétől és elvárt időtartamától, valamint a kezelni vagy megelőzni kívánt állapot természetétől függ.

A találmány egy másik jellemző megvalósítási módja szerint a találmány szerinti készítmények hordozóiként biológiailag lebontható mikrogömböket (pl. polilaktát-poliglikolat gömböket) alkalmazunk. Az e célra alkalmas, biológiailag lebontható mikrogömböket, például, a 4 897 268, 5 075 109, 5 928 647, 5 811 128, 5 820 883, 5 853 763, 5 814 344, 5 407 609 és 5 942 252 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban tárták fel. Számos esetben hasznosak a módosított hepatitis-B core-protein rendszerek (ld. pl. a WO 99/40934 nemzetközi közzétételi iratot, valamint az abban felsorolt hivatkozásokat). Egy másik jellemző hordozó/célbajuttató rendszerben szemcsés proteinkomplexeket tartalmazó hordozót alkalmaznak (ld. pl. az 5 928 647 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást), melyek a gazdában MHC I. korlátozott citotoxikus T-limfocita reakciók indukálására képesek.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények gyakran további komponenseket is tartalmazhatnak, így pl. egy vagy több puffert (pl. semleges puffert vagy foszfát-puffert), szénhidrátokat (pl. glükózt, mannózt, szacharózt vagy dextránokat), manitolt, proteineket, polipeptideket vagy aminosavakat (pl. glicint), antioxidánsokat, bakteriosztatokat, kelátképzőket (pl. EDTA vagy glutation), adjuvánsokat (pl. alumínium-hidroxidot), a készítményt - a páciens véréhez viszonyítva - izotóniássá, hipotóniássá vagy gyengén hipertóniássá tevő oldott anyagokat, szuszpendálószerkeket, sűrítőanyagokat és/vagy tartósítószerkeket. Más módon, a találmány szerinti készítmények liofilizátum formájában is előállíthatók.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények egységdózisú vagy több dózisú tartályokban (pl. lezárt ampullákban vagy fiolákban) szerelhetők ki. Az ilyen tartályokat rendszerint úgy zárjuk le, hogy felhasználásig megőrizze a készítmény sterilitását és stabilitását. A készítményeket rendszerint - olajos vagy vizes hordozókban készített - szuszpenziók, oldatok vagy emulziók formájában tároljuk. Más módon, a gyógyászati készítmények fagyasztva szá-
 5 rított (лиофилізált) állapotban is tárolhatók; ilyen esetben közvetlenül a felhasználás előtt steril, folyékony hordozó hozzáadására van szükség.

A találmány szerinti készítmények különböző kezelési sémákban történő alkalmazáshoz (pl. orális, parenterális, intravénás, intranazális vagy intramuszkuláris adagoláshoz) megfelelő dozírozása szakember számára jól ismert, melyek közül néhányat az alábbiakban röviden ismertetünk.

Bizonyos esetekben a találmány szerinti gyógyászati készítményeket orálisan adagolhatjuk az állatnak. Ilyen célra a készítmények inert diluendum vagy asszimilálható, ehető hordozó alkalmazásával, kemény vagy lágy zselatinkapszulákba foglalva vagy tablettákká préselve
 15 állíthatók elő, vagy közvetlenül a táplálékba keverhetők.

Az aktív vegyületek segédanyagokkal elegyítve lenyelhető tabletták, bukkális tabletták, pasztillák, kapszulák, elixírek, szuszpenziók, szirupok, ostyák, stb. alakjában foglalhatók készítménybe [ld. pl. Mathiowitz és mtsai.: *Nature* **386**, 410 (1997); Hwang és mtsai.: *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **15**, 243 (1998); valamint az 5 641 515, 5 580 579 és 5 792 451
 20 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat]. A tabletták, pasztillák, pirulák, kapszulák és hasonló további komponenseket is tartalmazhatnak, így pl. kötőanyagokat (pl. tragantmészga, akácmészga, kukoricakeményítő vagy zselatin), segédanyagokat (pl. dikalcium-foszfát), szétesést elősegítő anyagot (pl. kukoricakeményítő, burgonyakeményítő, algin-sav és hasonló), lubrikánst (pl. magnézium-sztearát), édesítőt, pl. szacharózt, laktózt vagy szaccharint, valamint
 25 ízanyagokat (pl. mentaolaj, gaulteria-olaj vagy cseresznyearoma). Ha az egységdózis-készítmény kapszula, a fentebb felsorolt anyagokon kívül folyékony hordozót is tartalmazhat. Bevonatként vagy az egységdózis fizikai alakjának egyéb módosítása érdekében további anyagok is alkalmazhatók. Például, a tabletták, pirulák vagy kapszulák sellakkal, cukorral (vagy a kettő kombinációjával) vonhatók be. Természetesen, az egységdózis-alakok előállítására al-
 30 kalmazott anyagoknak gyógyászati szempontból tisztának kell lenniük, és az alkalmazott mennyiségekben lényegében nem lehetnek toxikusak. Ezen túlmenően, az aktív vegyületek tartós hatóanyag-felszabadulást biztosító készítménybe is foglalhatók.

A találmány szerinti készítmények az aktív vegyületet rendszerint legalább 0,1 % koncentrációban tartalmazzák, bár az aktív összetevő(k) koncentrációja - a készítmény össztömegére vagy összterfogatára vonatkoztatva - kb. 1 vagy 2 % és kb. 60 % vagy 70 % között változhat. Természetesen, a gyógyászati készítményben az aktív vegyület(ek) mennyiségét úgy kell megválasztani, hogy minden egységdózis megfelelő dozírozást tegyen lehetővé. A gyógyászati készítmények előállítása során különböző tényezőket kell figyelembe venni, így pl. az oldékonyságot, a biológiai hozzáférhetőséget, biológiai felezési időt, az adagolás módját, a termék tárolhatósági idejét, valamint egyéb gyógyászati megfontolásokat kell figyelembe venni, mivel számos adagolási és kezelési séma lehetséges.

A találmány szerinti, orális adagolásra szánt készítmények, egy vagy több segédanyag alkalmazásával, szájvíz, fogápoló krém, bukkális tabletták, orális spray vagy szublingvális készítmény formájában is előállíthatók. Más módon, az aktív összetevőt orálisan adagolható oldatba (pl. nátrium-borátot, glicerint és kálium-hidrokén-karbonátot tartalmazó oldatba) foglalhatjuk, fogápoló krémbe diszpergálhatjuk, vagy terápiásan hatásos mennyiségben - vizet, köztanyanyagokat, dörzsanyagokat, izanyagokat, habosítókat és nedvesítőszerkeket tartalmazó - készítményhez adhatjuk. Más módon, a készítményeket nyelv alá helyezhető (vagy a szájüregben más módon felszívódó) tabletták vagy oldatok formájában is előállíthatjuk.

A találmány szerinti gyógyászati készítményeket, bizonyos esetekben, kívánatos lehet parenterálisan, intravénásan, intramuszkulárisan vagy intraperitoneálisan adagolni. Az ilyen megoldások szakember számára jól ismertek (néhányuk leírását illetően ld. pl. az 5 543 158, 5 641 515 és 5 399 363 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat). A találmány bizonyos megvalósítási módjai értelmében az aktív vegyületet - szabad bázis vagy gyógyászati szempontból elfogadható só alakjában - vizes oldatként állítjuk elő, amely alkalmas módon felületaktív anyaggal (pl. hidroxipropilcellulózzal) elegyíthető. Glicerinben, folyékony polietilén-glikolokban és elegyekben, valamint olajokban diszperziók is előállíthatók. Szokványos tárolási és alkalmazási feltételek mellett az ilyen készítmények általában tartósítószerkeket is tartalmaznak, melyek megakadályozzák a mikroorganizmusok elszaporodását.

Az injektálható gyógyászati készítmények jellemző példái a steril vizes oldatok vagy diszperziók (ld. pl. az 5 466 468 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást). Az injektálható készítménynek minden esetben sterilnek és - a könnyű fecskendezhetőséghez szükséges mértékben - folyékonnak, továbbá a gyártási és tárolási feltételek mellett stabilnak kell lennie. A mikroorganizmusok (pl. baktériumok és gombák) károsító hatásának megelőzése céljából az ilyen készítményeket is tartósítani kell. Hordozóként oldószert vagy diszpergálóközeget, így

pl. vizet, etanolt, polialkoholt (pl. glicerint, propilénglikolt, folyékony polietilénglikolt és hasonlókat), valamint ezek keverékeit és/vagy növényi olajokat alkalmazhatunk. A megfelelő fluiditás, például, nedvesítőanyag (pl. lecitin) alkalmazásával, diszperziók esetében a kívánt szemcseméret biztosításával, és/vagy felületaktív anyagok alkalmazásával érhető el. A mikro-

5 organizmusok hatása különböző antibakteriális és gombaellenes hatóanyagok - például, parabének, klórbutanol, fenol, szorbinsav, thimerosal és hasonlóak - alkalmazásával gátolható. Számos esetben előnyös az izotonizáló anyagok (pl. cukrok vagy nátrium-klorid) alkalmazása is. Az injektálható készítmények hosszú időtartamú felszívódása abszorpciót késleltető ható-

anyag-készítmények (pl. alumínium-monosztearát és zselatin) alkalmazásával biztosítható.

10 A találmány egyik megvalósítási módja szerint, a parenterális adagolásra szánt vizes oldatot, szükség esetén, megfelelően puffereljük, és először a folyékony diluendumot izotonizáljuk megfelelő mennyiségű sóoldattal vagy glükózzal. Az ilyen vizes oldatok különösen hasznosak az intravénás, intramuszkuláris, szubkután és intraperitoneális adagolási módokhoz. Az e célra alkalmas, steril, vizes közegek a leírás alapján szakember számára jól ismertek.

15 Például, egy dózist 1 ml izotóniás NaCl-oldatban oldunk, majd a kapott oldatot 1000 ml hipodermoclysis folyadékhoz adjuk vagy az előre kiválasztott infúziós helyre injektáljuk (ld. pl. "Remingtons' s Pharmaceutical Sciences", 15. kiadás, 1035-1038. és 1570-1580. oldalak). A dozírozás a kezelni kívánt páciens állapotától függően változó lehet. Emberek kezelése esetén a készítményeknek meg kell felelniük az FDA Office of Biologics Standards által előírt sterilitási, pirogenitási és általános biztonsági és tisztasági követelményeknek.

20

A találmány egy további megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti készítményeket neutrális vagy só alakban állíthatjuk elő. A gyógyászati szempontból elfogadható sók jellemző példái közé tartoznak a savaddíciós sók (melyek a protein szabad aminos csoportjaival kerülnek kialakításra), és amelyek szerves savak (pl. sósav vagy foszforsav) vagy szerves

25 savak (pl. ecetsav, oxálsav, borkősav, mandulasav, stb.) hozzáadásával állíthatók elő. A gyógyászati szempontból elfogadható sók közé tartoznak a protein szabad karboxil csoportjaival létrehozható bázisaddíciós sók is, amelyek szerves bázisokból (pl. nátrium-, kálium-, ammónium-, kalcium- vagy vas-hidroxidból) vagy szerves bázisokból (pl. izopropilaminból, trimetilaminból, hisztidinből, prokainból és hasonlókból) származtathatók. Az oldatokat - elkészítésük

30 után - a dózisalaknak megfelelő és terápiás szempontból hatásos mennyiségben adagoljuk.

A hordozók - a fentiek mellett - tartalmazhatnak különféle oldószereket, diszpergálóközegeket, vehiculumokat, nedvesítőszereket, diluendumokat, antibakteriális és gombaellenes hatóanyagokat, izotonizáló és abszorpciót késleltető hatóanyagokat, puffereket, vivőoldatokat,

szuszpenziókat, kolloidokat és hasonlókat. Az ilyen közegek és hatóanyagok alkalmazása szakember számára jól ismert és ezek találmány szerinti készítményekben történő alkalmazása - hacsak nem összeférhetetlen az aktív komponenssel - a találmány oltalmi körébe tartozik. A "gyógyászati szempontból elfogadható" kifejezés olyan molekuláris entitásokra és készítményekre vonatkozik, amelyek embernek beadva nem okoznak allergiás vagy egyéb, nem kívánatos reakciókat.

A találmány bizonyos megvalósítási módjai értelmében a gyógyászati készítményeket orrspray, belélegeztetés és/vagy egyéb aeroszolos eszköz alkalmazásával adagoljuk a betegnek. A gének, nukleinsavak vagy peptidek készítményeinek - aeroszolos orrspray alkalmazásával - közvetlenül tüdőbe történő adagolását, például, az 5 756 353 és 5 804 212 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban tárták fel. A hatóanyagok intranazális mikroszemcsés gyanták [ld. Takenaga és mtsai.: J. Controlled Release 52, 81 (1998)], illetve lizofoszfatidil-glicerinné származékok alkalmazásával (ld. 5 725 871 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás) végzett adagolása szintén jól ismert. Ezen túlmenően, az 5 780 045 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban politetrafluoretilén hordozóközeg alkalmazásával végzett, nyálkahártyán keresztüli hatóanyag-célbajuttatást tártak fel.

A találmány bizonyos megvalósítási módjaiban a találmány szerinti készítmények megfelelő gazdasejtekbe vagy gazdaszervezetekbe történő bejuttatására liposzómákat, nanokapszulákat, mikroszemcséket, lipidszemcséket, vezikulákat és hasonlókat alkalmazunk. A találmány szerinti készítmények lipidszemcsébe, liposzómába, vezikulába, nanogömbbe, nanoszemcsékbe és hasonlókba ágyazott alakban, illetve, más módon, az ilyen hordozók felületéhez kovalens vagy nem kovalens kötéssel kapcsolva tehetők alkalmassá a célbajuttatásra.

A liposzóma és liposzómaszerű készítmények potenciális hatóanyag-hordozóként történő előállítás és alkalmazása szakember számára jól ismert [ld. pl. Lasic: Trends Biotechnol. 16, 307 (1998); Takakura: Nippon Rinsho 56, 691 (1998); Chandran és mtsai.: Indian J. Exp. Biol. 35, 801 (1997); Margalit: Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 12(2-3), 233 (1995); valamint az 5 567 434, 5 552 157, 5 565 213, 5 738 868 és 5 795 587 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat, mely forrásokat teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintjük].

A liposzómákat számos olyan sejttípus esetében alkalmazták sikeresen, amelyeket más módszerekkel bonyolult transzfektálni, ideértve a T-sejt-szuszpenziókat, elsődleges hepatocita-tenyészeteket és a PC-12-sejteket [Renneisen és mtsai.: J. Biol. Chem. 265, 16377 (1990); Müller és mtsai.: DNA Cell Biol. 9, 221 (1990)]. Ezen túlmenően, a liposzómák esetében nin-

csenek DNS-hosszúságra vonatkozó megszorítások, mint a vírusalapú célbajuttató rendszerek-nél. A liposzómákat hatékonyan alkalmazták gének, különféle drogon, radioterápiás hatóanyagok, enzimek, vírusok, transzkripció faktorok, alloszterikus effektorok és hasonlók tenyésztett sejtvonalakba és állatokba történő bejuttatására. Ezen túlmenően, a liposzómák alkalmazása esetén a szisztémás bejuttatást követően nem lépnek fel autoimmun reakciók és nem kívánatos toxicitási mellékhatások.

Bizonyos megvalósítási módok értelmében a liposzómák foszfolipidekből állíthatók elő, melyek vizes közegben végzett diszpergálást követően spontán multilamelláris, koncentrikus, kétrétegű vezikulákká (más néven multilamelláris vezikulákká, MLV) alakulnak.

Más módon, a találmány egyik megvalósítási módja értelmében, a találmány szerinti készítmények gyógyászati szempontból elfogadható nanokapszulás alakjait tárjuk fel. A nanokapszulákba a vegyületek általában stabil és reprodukálható módon vannak befoglalva [ld. pl. Quintanar-Guerrero és mtsai.: Drug Dev. Ind. Pharm. 24, 1113 (1998)]. Az intracelluláris polimeres túltöltöttség mellékhatásainak elkerülése érdekében az ilyen ultrafinom (kb. 0,1 µm-es) szemcsék *in vivo* lebontható polimerek alkalmazásával tervezhetők. A szemcsék előállítására, például, a Couvreur és mtsai. [Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 5, 1 (1998)], zur Muhlen és mtsai. [Eur. J. Pharm. Biopharm. 45, 149 (1998)] és Zambaux és mtsai. [J. Controlled Release 50, 31 (1998)] által leírt, és az 5 145 684 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban feltárt eljárások alkalmazhatók.

Ráktérápiás eljárások

A találmány további szempontjainak megfelelően, a találmány szerinti gyógyászati készítményeket rák kezelésére, elsősorban vastabélrák vagy vastag- és végbélrák immunterápiájára alkalmazhatjuk. A találmány egyéb megvalósítási módjai értelmében a készítményeket emlőrák vagy nem kissejtes tüdőcarcinoma kezelésére alkalmazhatjuk. A találmány szerinti készítmények jellemzően olyan betegek kezelésére hasznosak, akik cripto-antigén termelésével jellemezhető ráktól szenvednek és/vagy akikben a cripto-antigén a metasztázisokban termelődik. Az ilyen eljárások során a találmány szerinti gyógyászati készítményeket egy páciensnek, jellemzően melegvérű állatnak, előnyösen embernek adagoljuk. A páciens rákos vagy ráktól még nem szenvedő egyaránt lehet. Ilyenformán, a találmány szerinti gyógyászati készítmények rák kialakulásának gátlására és ráktól szenvedő páciens kezelésére egyaránt alkalmazható. A gyógyászati készítményeket és vakcinákat az elsődleges tumorok sebészeti eltávolítását és/vagy radioterápiás vagy hagyományos kemoterápiás kezelést megelőzően vagy azt követően egyaránt adagolhatjuk. Ahogy fentebb említettük, a gyógyászati készítmények adagolását bármely

alkalmas módon, így pl. intravénásan, intraperitoneálisan, intramuszkulárisan, szubkután, intranazálisan, intradermálisan, análisan, vaginálisan, topikusan és orálisan végezhetjük.

A találmány bizonyos megvalósítási módjai értelmében az immunterápiát aktív immunterápiaként végezzük, ami a gazdaszervezet immunrendszerének - immunreakciót módosító hatóanyagok (pl. a találmány szerinti polipeptidek és polinukleotidok) adagolásával végrehajtott - *in vivo* stimulálásán alapul, amelynek eredményeként az immunrendszer a tumorokkal lép reakcióba.

A találmány további megvalósítási módjai értelmében az immunterápiát passzív immunterápiaként végezzük, melynek során olyan hatóanyagokat juttatunk be a páciensbe, amelyek tumorelles immunreaktivitással bírnak (pl. effektor-sejtek vagy antitestek), közvetlenül vagy közvetve tumorelles hatásokat közvetítenek, és nem igénylik, hogy a gazdaszervezet immunrendszere ép legyen. Az effektor-sejtek példái közé tartoznak a fentebb leírt T-sejtek, T-limfociták (pl. CD8⁺ citotoxikus T-limfociták és tumorba infiltrálódó CD4⁺ T-helper limfociták), ölüsejtek (pl. természetes ölüsejtek és limfokin-aktiválta ölüsejtek), B-sejtek és antigénprezentáló sejtek (pl. dendritikus sejtek és makrofágok), melyek találmány szerinti polipeptidet termelnek. A találmány szerinti polipeptidekre specifikus T-sejt-receptorok és antitest-receptorok adoptív immunterápia céljából klónozzhatók, expresszáltathatók és egyéb vektorokba vagy effektor-sejtekbe juttathatók.

Az effektor-sejtek adoptív immunterápiához szükséges mennyiségét rendszerint *in vitro* sejtenyésztéssel állíthatjuk elő. Az antigénspecifikus effektor-sejtek (*in vivo* antigénfelismerés megőrzése mellett) több milliós sejtszám eléréséig történő tenyésztésére alkalmas feltételek szakember számára jól ismertek. Az ilyen *in vitro* tenyésztési feltételek rendszerint magukban foglalják az antigénnel végzett szakaszos stimulációt (gyakran citokinek, pl. IL-2, és nem osztódó táplálósejtek jelenlétében). Ahogy fentebb említettük, a találmány szerinti immunreaktív polipeptidek az antigénspecifikus T-sejtek tenyészteteinek gyors gyarapítására - s ezáltal az immunterápiához kellő számú sejt létrehozására - alkalmazhatók. Közelebbről, antigénprezentáló sejteket (pl. dendritikus sejteket, makrofágokat, monocitákat, fibroblasztokat és/vagy B-sejteket) impulzusszerűen az immunreaktív polipeptidekkel kezelhetünk vagy - szakember számára jól ismert, standard eljárások alkalmazásával - egy vagy több polinukleotiddal transzfektálhatunk. Például, az antigénprezentáló sejteket - rekombináns vírusban vagy más expressziós rendszerben az expresszió fokozására alkalmas promotert tartalmazó - polinukleotiddal transzfektálhatjuk. A terápiás célra tenyésztett effektor-sejteknek *in vivo* szaporodásképesnek és jó eloszlási képességűnek kell lenniük, és hosszú ideig életben kell marad-

niuk. Kísérletekkel kimutatták, hogy a tenyésztett effektor-sejtek Il-2-vel kiegészített antigénnel végzett, ismételt stimulációval *in vivo* szaporodásra és hosszú időtartamú életbenmaradásra indukálhatók [ld. pl. Cheever és mtsai.: Immunological Reviews 157, 177 (1997)].

Más módon, egy találmány szerinti polipeptidet expresszázó vektort egy páciensből származó antigénprezentáló sejtekbe juttatunk be, a sejteket *ex vivo* szaporítjuk, majd visszaültetjük ugyanazon páciensbe. A transzfektált sejteket szakember számára jól ismert módszerek alkalmazásával (előnyösen steril módon, intravénás, intracavitáris, intraperitoneális vagy intratumorális adagolással) juttathatjuk vissza a páciensbe.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények adagolásának módja és gyakorisága, valamint dózisa egyénről egyénre változó, és standard technikák alkalmazásával könnyen meghatározható. A találmány szerinti gyógyászati készítmények és vakcinák általában injektálással (pl. intrakután, intramuszkuláris, intravénás vagy szubkután injekcióval), intranazálisan (pl. belélegeztetéssel) vagy orálisan adagolhatók. Előnyösen 52 hét alatt 1-10 dózis adható. Előnyösen egy hónapos időközönként hat dózist adunk be, és utána időközönként emlékeztetőoltást adunk. Az egyes páciensek esetében más és más séma lehet alkalmas. A megfelelő dózis az adott vegyület azon mennyisége, amely a fentiek szerint adagolva képes tumorelles immunreakció kiváltására, amely legalább 10-50 %-kal nagyobb az alapszintnél (vagyis a nem kezelt páciensek esetében megfigyelhető reakciónál). A kiváltott reakció a páciensben lévő tumorelles antitestek mennyiségének mérésével vagy a páciens tumorsejtjeinek *in vitro* elpusztítására képes citolitikus effektor-sejtek vakcina-dependens létrehozásával ellenőrizhető. Az ilyen vakcinák képesek olyan immunreakció indukálására is, amely a vakcinált páciensekben - a nem vakcinált betegekkel összehasonlítva - javított klinikai eredményhez (pl. gyakoribb enyhüléshez, részleges vagy teljes vagy hosszú idejű, tünetmentes túléléshez) vezető immunreakciót képes indukálni. Az egy vagy több találmány szerinti polipeptidet tartalmazó gyógyászati készítményekben és vakcinákban az egyes polipeptidek kb. 25 µg/testtömeg-kilogrammtól 5 mg/testtömeg-kilogrammig terjedő dózistartományban vannak jelen. A dózismennyiség a páciens testtömegétől függően változik, de általában kb. 0,1-5 ml megfelelő.

A megfelelő dozírozás és kezelési séma általában biztosítja az aktív vegyület(ek) terápiás és/vagy profilaktikus előny eléréséhez szükséges mennyiségét. Az ilyen reakció a kezelt páciensekben - a nem kezelt betegekkel összehasonlítva - a javított klinikai eredmény (pl. gyakoribb enyhülések, részleges vagy teljes vagy hosszú idejű, tünetmentes túlélés) megállapításával ellenőrizhető. Egy tumorproteinre irányuló, már létező immunreakciók fokozódása általában összhangban van a javított klinikai eredménnyel. Az ilyen immunreakciók rendszerint stan-

dard proliferációs, citotoxicitási vagy citokin-tesztek alkalmazásával értékelhetők, melyeket a páciensből a kezelés előtt és után vett mintákkal végzünk.

1/a példa

Immunreaktív cripto-1 termelődése humán léziókban

	Szövet	Nem érintett epithelium	Pre-malignáns léziók		Karcinoma
			TA	TVA	
5	Vastagbél	25/193(13)	26/65(40)	10/13(77)	122/168(73)**
	Gyomor	1/37(3)	16/30(53)	17/37(46)**	
	Pancreas	10/58(17)			58/98(59)**
			Hiperpláziák	Adenomák	
10	Epehólyag	n.m.	6/9(67)	4/7(58)	89/132(68)**
				DCIS	
	Emlő	5/33(15)		26/55(47)	497/631(79)**
	Nem kissejtes tüdő				178/195(91)**
	Szövet	Nem érintett	Cystadenomák	Savós	Nyákos epithelium
15			Savós	Nyákos	
	Petefészek	6/7(86)	6/14(43)	0/7	4/10(40)
		poszt-menopauzás			4/5(80)
					23/40(58)
					25/48(52)
20			3/9(33)	3/8(38)	4/8(40)
					Határvonal: 10/10
	Endometrium	10/28(36) poszt-menopauzás			53/91(58)*
				Hiperpláziák	
				18/30(60)	68/96(71)*
25	Cervix	4/25(17)			40/74(54)*
	Here	0/3			29/51(57)**
			Embrionális karcinómák	Seminómák	
			19/19 (100)**	10/32(31)	
30	Mellékvesekéreg			1/3 (33)	
	Húgyhólyag	0/6		23/39(60)**	
	Vese			0/18	
	Prosztata			0/9	
	TA = tubuláris				
35	TVC = tubulovillosus adenoma				
	IM = bél-metaplasia				

** a karcinómákban statisztikailag szignifikáns expresszió (a nem érintett szövetekhez viszonyítva).

1.b példa

Túlzott mértékű cripto-expresszió rákos szövetekben

A célprotein mRNS-transzkriptuma gyakoriságának normál és tumoros szövetekben és/vagy sejtvonalakban történő összehasonlítására valós idejű reverz transzkriptázos polimeráz-láncreakciót (RT-PCR) alkalmaztunk. Ez az analízis kulcsfontosságú a cripto-expresszió tumorspecifitásának megállapítása szempontjából, ami olyan kritérium, amelynek egy jó vakcina-jelöltnak meg kell felelnie.

Gyorsfagyasztott biopsziákból vagy sejtvonalakból "TriPure" reagens (Roche) alkalmazásával össz-RNS-t vontunk ki. A normál szövetekből származó össz-RNS-eket az Invitrogen-től vásároltuk. Az össz-RNS-ből oligo-dT mágneses golyók (Dyna) alkalmazásával végzett DNáz-os kezelést követően poli-A⁺-mRNS-t tisztítottunk. Az mRNS mennyiségi meghatározását "RiboGreen" színezék (Molecular Probes) alkalmazásával végzett spektrofotometriával hajtottuk végre.

A valós idejű reverz transzkriptázos polimeráz-láncreakcióhoz alkalmazott "TaqMan" láncindító oligonukleotidokat (5' -láncindító: TGGGTAGGAAAGAGGAAGCAAAT; 7. azonosítószámú szekvencia); 3' -láncindító: TGCTTCTCTACCACCACCTAATCA; 8. azonosítószámú szekvencia) és próbát Perkin-Elmer Primer Express szoftverrel (a "TaqMan" amplifikációs feltételek alapértelmezett paramétereinek alkalmazásával) terveztük meg.

A valós idejű reakciókat a standard polimeráz-láncreakciós technikáknak megfelelően, mindegyik reakcióhoz 2 ng reverz transzkriptált mRNS (Expand RT, Roche) alkalmazásával végeztük. A vizsgált mintától függően "SybrI" vagy "TaqMan" detektálást alkalmaztunk. A SybrI-detektáláshoz a reakcióelegyhez 1/75000 véghígításban SybrI-színezéket (Molecular Probes) adtunk, és a TaqMan-próbát kihagytuk. Az amplifikálást (40 ciklus) és a valós idejű detektálást, Perkin-Elmer Biosystems PE7700-rendszerrel, szokványos készülék-beállítás alkalmazásával hajtottuk végre. A Ct-értékeket PE7700 Sequence Detector szoftver alkalmazásával számítottuk ki. A Ct-értékeket mindegyik szövetmintából cél-mRNS-re (CtX), illetve aktin-mRNS-re (CtA) kaptuk.

Mivel az elterjedt kísérleti feltételek mellett a PCR-amplifikáció hatékonysága közel áll az elméleti amplifikációs hatékonysághoz, a $2^{(CtA-CtX)}$ érték a minta relatív céltranszkriptum-szintjének becsült értéke (az aktin-transzkriptum szintjére standardizálva). Ilyenformán, ha ez az érték 1, a kiszemelt antigén és az aktin expressziós szintje azonosnak tekinthető.

A SybrI-detektálás alkalmazásával végzett reverz transzkriptázos polimeráz-láncreakció analízist hat különböző páciensből származó vastagbél-tumorokon és azokkal páro-

sított normál vastagbélmintákon, illetve 48 normál szövetmintán hajtottuk végre. A TaqMan-detektálást hat másik páciensből származó vastagbél-tumorokon és azokkal párosított normál vastagbélmintákon (a reakciókat három ismétléssel végezve), illetve 48 normál szövetmintán hajtottuk végre. A tesztelt normál szövetek a következők (zárójelben az ábrákon alkalmazott rövidítések): mellékvese (Ad_GI), aorta (Ao), húgyhólyag (Bl), csontvelő (Bo_Ma), agy (Bra, Bra1, Bra2, Bra3, Bra4, Bra5), cervix (Ce), vastagbél (Co), petevezeték (Fa_Tu), szív (He), csípőbél (Il), vese (Ki), máj (Li, Li1, Li2), tüdő (Lu), nyirokcsomó (Ly_No), nyelőcső (Oe), petefészek (Ov), hasnyálmirigy (Pa, panc1, panc2), mellékpajzsmirigy (Pa_Thy), méhlepény (Pl), prosztata (Pr), végbél (Re), bőr (Sk), vázizom (Sk_Mu), vékonybél (Sm_In), lép (Sp), gyomor (St), here (Te), pajzsmirigy (Thyr, Thy, Thy1, Thy2), csecsemőmirigy (Thym1, Thym2), trachea (Tr, Tra).

A valós idejű RT-PCR-reakciókat (SybrI-detektálás alkalmazásával) hét tüdősejtvonallal:

CRL-5803 (carcinoma, nem kis sejtes tüdőrák, nagy sejt, neurodenokrin, metasztázis helye: nyirokcsomó);

CRL-5807 (bronchioalveolaris carcinoma, nem kis sejtes tüdőrák);

CRL-5810 (adenocarcinoma, nem kis sejtes tüdőrák);

CRL-5815 (carcinoid, bronchus);

CRL-5865 (adenocarcinoma, metasztázis helye: mellúri folyadékgyülem);

CRL-9609 (normál tüdő, bronchus, epithelialis, vírussal transzformált);

HTB-177 (carcinoma, nagysejtes tüdőrák, mellúri folyadékgyülem);

és két vastagbél-sejtvonallal is elvégeztük:

CRL-2159 (carcinoma, cecum, Dukes' B);

CCL-250.

A reakciókat - kontrollként - normál tüdőszövetekből vett friss biopsziával [Lu(ucl), Lu(IVG)] és egy tüdőtumorszövet-mintával (LuTum) is elvégeztük.

Az vastag- és végbélrák biopsziákkal és normál szövetekkel végzett RT-PCR-analízis eredményeit az 1., 2., 3. és 4. ábrán, illetve az 1. táblázatban mutatjuk be. A sejtvonalakkal végzett RT-PCR-analízis eredményeit az 5. ábrán mutatjuk be.

1. táblázat

Cripto-expresszió vastag-végbéltumorokban és normál szövetekben

	Sybr-detektálás ¹	TaqMan-detektálás ¹
	Vastag-végbéltumor vs. szomszédos normál vastagbél- szövet	
Túlzott mértékű expressziót mutató páciensek száma	5/6	5/6
A túlzott mértékű expresszió átlagos szintje a túlzott mértékű expressziót mutató páciensekben (x-szeres)	200	90
A túlzott mértékű expresszió mediánja (x-szeres, minimum-maximum)	64 (22-724)	20 (4-397)
Túlzott mértékű expressziót mutató páciensek száma	Vastag-végbéltumor vs. normál szövetek átlaga ²	
Túlzott mértékű expressziót mutató páciensek száma	5/6	4/6
A túlzott mértékű expresszió átlagos szintje a túlzott mértékű expressziót mutató páciensekben (x-szeres)	10	12
A túlzott mértékű expresszió mediánja (x-szeres, minimum-maximum)	11 (3-22)	7 (3-32)
Nagy transzkripció szintet mutató normál szövetek (normál:tumoros arány)	Lép (0,5)	Lép (0,75), petefészek (2) ⁴

¹ A transzkriptum-szintet vastag-végbéltumorokban és normál szövetekben, két detektálási technika (Sybr és TaqMan) alkalmazásával számítottuk. A cripto vonatkozásában, a TaqMan-

detektálást hat pácienssel végeztük, és a méréseket háromszor ismételtük, míg a Sybr-detektálást hat másik pácienssel hajtottuk végre;

² A vastag-végbéltumorokban mért transzkriptum-szintet az ugyanazon páciensből származó normál vastagbéliszövetben mért szinttel és a normál szövetekben mért transzkriptum-szint átlagával hasonlítottuk össze;

³ Egy normál szövet transzkriptum-szintjét akkor tekintjük nagynak, ha nagyobb, mint a vastag-végbéltumor transzkriptum-szintjének egyötöde;

⁴ A cripto-Sybr kísérletben a petefészekszövetet nem értékeltük.

Az 1. táblázatban, illetve az 1., 2., 3. és 4. ábrákon bemutatott eredmények egyértelműen azt mutatják, hogy a cripto-expresszió (bár felnőttek normál szöveteiben határértéken kimutatható), a vastag-végbéltumorok többségében sokszoros (tízszeres vagy nagyobb) értékkel detektálható. Ezen túlmenően, ahogy az 5. ábrán látható, a cripto-expresszió az CRL-5815 tüdőtumor-sejtvonalban rendkívül nagymértékű; ilyenformán, a tumorasszociált cripto-antigén vastag-végbélrákos, illetve tüdőrákos betegek kezelésére egyaránt alkalmas vakcina-jelölt.

2. példa

Cripto-1-cDNS klónozása tüdőtumor-sejtvonalakból

Hét különböző tüdőtumor-sejtvonal (a sejtvonalak teljes listáját ld. az 1. szakaszt) egyenként 10^7 tenyésztett sejtjéből - TriPure-reagens alkalmazásával - össz-RNS-t vontunk ki.

Az össz-RNS-eket összekevertük, majd az össz-RNS elegyből oligo-d(T) mágneses golyók (Dynal) alkalmazásával mRNS-t tisztítottunk. A cDNS-szintézisre az mRNS 250 ng-ját használtuk fel. Az mRNS mennyiségi meghatározását RiboGreen-színezék (Molecular Probes) alkalmazásával, spektrofotometriás analízissel (VersaFluor, BioRad) végeztük. A cDNS-t "GeneRacer" technológia (Invitrogen) alkalmazásával szintetizáltuk, amely csak a teljes hosszúságú transzkriptumok amplifikálását teszi lehetővé. Az mRNS-t CIP-vel kezeltük, az 5'-végi "cap" eltávolítása céljából TAP-vel (dohány savas pirofoszfátáz) reagáltattuk, majd specifikus RNS-oligonukleotidhoz ligáltuk. A ligált mRNS-t reverz transzkripcióval - oligo-d(T)-farkat tartalmazó láncindító oligonukleotid alkalmazásával - cDNS-sé alakítottuk, és a cDNS-t mindkét "GeneRacer" szegélyező láncindító oligonukleotid (Advantage, Clontech) alkalmazásával amplifikáltuk. A cripto-cDNS amplifikálását 10 ng GeneRacer cDNS és génspecifikus PCR-láncindítók (5'-láncindító: CGTCCAAGGCCGAAAGCCCTCCAGTT, 9. azonosítószámú szekvencia; 3'-láncindító: TTGGGAGAGGGCAGGGCAAAGAAGTAAGAA, 10. azonosítószámú szekvencia) alkal-

mazásával hajtottuk végre. A polimeráz-láncreakciót standard reakciófeltételekkel, "Advantage II" Taq-DNS-polimeráz (Clontech) alkalmazásával végeztük. A PCR-terméket pCR4-TOPO-plazmidba (Invitrogen) klónoztuk. Az amplifikált szekvencia (95. azonosítószámú szekvencia) a 22. kodonnál variációt mutat: a natív változatban (6. azonosítószámú szekvencia) lévő Val-kodon (GTC) helyett Ala-kodont (GCC) tartalmaz. A natív változatot PCR-mutagenézissel állítottuk helyre.

3. példa

A tumorasszociált cripto-antigén immunogenitásának tanulmányozása állatmodellekben

A találmány szerinti antigén immunogenitása nyulak és egerek különböző immunizálási módszerekkel végzett immunizálásával igazolható. A cripto-alakokkal (peptiddel vagy rekombináns proteinnel) végrehajtott immunizálás cripto-antigén elleni specifikus antitestek termelődésével járó humorális immunreakciót és/vagy cripto-specifikus celluláris immunreakciót indukál. A cripto-protein immunogenitásának bizonyítására szintén alkalmas lehet a cripto-proteint vagy fragmenseit kódoló csupasz DNS-t hordozó vektor vagy a cripto-proteint vagy fragmenseit kódoló cripto-géneket hordozó vírusvektor *in vivo* célbajuttatása.

3.1. Immunizálás szintetikus peptiddel

A nyulak immunizálására kiválasztott, cripto-1 aminosav-szekvenciából származó szintetikus peptidek a következők: GHQEFARPSRGYL (13 aminosav, 11. azonosítószámú szekvencia) és QEEPAIRPRSSQRVPPMG (18 aminosav, 12. azonosítószámú szekvencia). A szintetikus peptideket hordozóproteinhez (KLH) konjugáltuk, majd a konjugátumokat Freund-féle adjuvánssal együtt készítménybe foglaltuk, és a konjugátumok mindegyikével két-két nyulat immunizáltunk. A második immunizálás után négy héttel, és a harmadik immunizálás után négy héttel vérmintát vettünk. Az anti-cripto antitest-titerekkel ELISA-tesztel és/vagy western-blot analízissel (standard eljárások alkalmazásával) határoztuk meg (ld. az alábbi, 3.5. pontban leírtakat).

3.2. Immunizálás nukleinsavakkal

A vakcinálásra alkalmazható plazmid előállítására pcDNA3.1-vektort (Invitrogen) alkalmaztunk. Az *in vivo* transzlálódó protein szekréciójának elősegítése - és ezáltal a találmány szerinti antigén elleni humorális reakció indukálása - érdekében a vektor poli-klónozóhelyére cripto-1-et kódoló nukleinsav-szekvenciát inszertáltunk (saját szignálszekvenciájával együtt). A rekombináns expressziós plazmidot *E. coli* gazdasejtek (pl. BL21) transzformálására alkalmaztuk.

Ezt a rekombináns *E. coli* törzset szokványos sejtenyésztő tápközegben tenyésztettük, majd a sejteket a stacionárius szaporodási fázis elérése előtt betakarítottuk. A plazmidot az egerekbe történő injektálás céljából Quiagen-rendszer alkalmazásával foglaltuk készítménybe.

- 5 A rekombináns expressziós plazmidot intramuszkuláris injekcióval 6-8 hetes Balb/c-egerekbe juttattuk be. Az utolsó injektálás után két héttel vérmintát vettünk. A találmány szerinti antigén ellen termelődött, specifikus antitestek titerét ELISA és/vagy western-blot analízissel határoztuk meg (ld. a 3.5. pontban leírtakat).

3.3. Vírusvektorral végzett immunizálás (adenovírusok alkalmazásával)

- 10 A rekombináns adenovírusok a gőnalapú vakcinálás céljaira hatásos vektorokként alkalmazhatók, mivel képesek a kódolt antigén elleni humorális és celluláris immunreakciók kiváltására. A cripto-1-proteint kódoló nukleotidszekvencia (saját szignálszekvenciájával együtt) megfelelő, adenovírus-eredetű virális vektorba inszertálható. Az rekombináns adenovirális vektort különböző adagolási módok alkalmazásával (intramuszkulárisan, intranazálisan, intra-
- 15 dermálisan, szubkután vagy intraperitoneálisan) adhatjuk be az egereknek. Két hét elteltével az egerekből vérmintákat vettünk, melyekben meghatároztuk a termelődött antitestek titerét. A celluláris immunreakció mérésére további kísérleteket végezhetünk.

3.4. Immunizálás rekombináns proteinnel

3.4.1. Rekombináns cripto-1-protein termeltetése és tisztítása

- 20 A találmány szerinti proteinantigén vagy fragmensei immunizálási célokra történő előállítására mikrobiális gazdasejtekben végzett termeltetést alkalmaztunk. A rekombináns proteinek két gazdában, *E. coli*-ban és élesztősejtekben (pl. *Saccharomyces cerevisiae*-ben vagy *Pichia pastoris*-ban) termeltethetők, ami lehetővé teszi az antigéntermelés szempontjából legkedvezőbb tulajdonságokkal bíró expressziós rendszer kiválasztását.

- 25 Az expressziós stratégia első lépése a rekombináns antigén elsődleges szerkezetének megtervezése. Az expressziós szint javítását szolgáló expressziós fúziós partnert (EFP) és/vagy az antigén immunogén sajátosságait módosító immunológiai fúziós partnert (IFP) az N-terminális végen helyezzük el, míg a további tisztítást elősegítő affinitási fúziós partner (AFP) a C-terminálishoz kapcsolható.

- 30 Ha a rekombináns törzsek rendelkezésre állnak, a rekombináns terméket expressziós szintjének meghatározásával és a génsebészeti módszerekkel manipulált protein oldékonyságának - nyers kivonatban megfigyelhető viselkedésének analízisének alapuló - megjósolásával karakterizáljuk.

A megfelelő tenyésztő tápközegben végzett tenyésztés és a rekombináns protein termelésének indukálása után az össz-kivonatokat SDS-PAGE-analízissel elemeztük. A rekombináns proteineket a gél festésével tettük láthatóvá, és - nyulak peptiddel végzett immunizálásával létrehozott (ld. a 3.1. pontot) - specifikus anti-peptid antitestek alkalmazásával végzett western-blot analízissel azonosítottuk.

A termelődött antigén különböző változatainak és az expressziós gazdasejtek összehasonlító elemzése lehetővé teszi a - további tisztításra és további immunológiai értékelésre alkalmas - legígéretesebb jelölt, illetve expressziós gazdasejt kiválasztását.

A tisztítás poli-hisztidines affinitási farok jelenlétén alapuló szokványos eljárással végezzük. Egy jellemző kísérletben a feltárt sejteket leszűrjük, és a sejtmentes extraktumot ionfém affinitási kromatográfiás oszlopra (IMAC; Ni⁺⁺NTA, Qiagen) töltöttük, amely specifikusan visszatartja a rekombináns proteint. A visszatartott proteineket foszfátpufferben 0-500 mM imidazol-gradienssel (esetleg detergens jelenlétében) eluáltuk.

3.4.2. Proteinnel végzett immunizálás

A 3D-MPL/QS21-adjuvánssal készítménybe foglalt rekombináns, tisztított proteinnel intramuszkulárisan, több alkalommal, több hetes időközönként nyulakat immunizáltunk. Az egyes immunizálások után három héttel vérmintákat vettünk. A vérsavóban az anti-cripto antitest-titert ELISA-analízissel határoztuk meg. Az anti-cripto antitestek specifikitását a tisztított protein alkalmazásával végzett western-blot analízissel, megfelelő kontrollok beiktatásával teszteltük (ld. a 3.5. pontban leírtakat).

3.5. Cripto-antigénnel immunizált állatok immunológiai reakcióinak tesztelése

A cripto-antigénnel végzett immunizálásra adott humorális immunválasz értékelése céljából az immunizált állatok vérsavójában ELISA és western-blot analízis alkalmazásával mértük a cripto-specifikus antitest-titert. Az ilyen tesztekben a következő - cripto-1-eredetű peptideket vagy teljes proteint tartalmazó - anyagok alkalmazhatók:

- szintetikus cripto-peptidek (az alkalmas peptideket illetően ld. a 3.1. pontban leírtakat);
- cripto-proteint termelő sejtvonalak tenyészetéből származó protein-kivonatok (az alkalmas sejtvonalakat illetően ld. az 1. szakaszt);
- cripto-szekvenciát tartalmazó rekombináns plazmid átmeneti expresszálatása céljából génmanipulált COS-sejtek lizátuma (ld. később);
- rekombináns *E. coli* vagy élesztőtörzsekből származó proteinkivonatok (a rekombináns törzs létrehozását illetően ld. a 3.3.1. pontban leírtakat);
- tisztított, rekombináns antigén (az antigén tisztítását illetően ld. a 3.3.1. pontban leírtakat).

A cripto-protein COS-sejtekben történő ideiglenes termeltetése a COS-sejtek - nukleinsav-vakcinálás céljára előállított - pcDNA3.1-plazmiddal végzett átmeneti transzfektálásával valósítható meg (ld. a 3.2. pontban leírtakat).

5 Az ELISA-teszthez a mikrotiter-tálcák üregeit a fentebb említett antigének egyikével (előnyösen tisztított, rekombináns proteinnel) vontuk be, majd az ELISA-tesztet standard eljárással hajtottuk végre.

A western-blot analízist szintén standard feltételek mellett, a fentebb említett antigének egyikének alkalmazásával (előnyösen tisztított, rekombináns proteinnel) végeztük (szintetikus peptideket nem alkalmaztunk).

10 A celluláris reakció értékelhető oly módon is, hogy a vakcinált egerekből származó lépsejteket - az immunizálására alkalmazott peptidekkel vagy az antigén aminosav-szekvenciáját együttesen teljes hosszában lefedő, antigén-eredetű, egymással átfedéssel peptidekkel - *in vitro* stimuláljuk.

15 4. példa

A cripto-specifikus humán T-sejtek létezésének bizonyítása *in vitro* indukcióval

A cripto-1 immunológiai relevanciáját humán T-sejtek *in vitro* indukálásával is igazolhatjuk. A kísérletben alkalmazott valamennyi T-limfocita, T-sejtvonal és dendritikus sejt egészséges donorok, illetve rákos betegek perifériás vérének egymagvú sejtjeiből (PBMC-sejtekből) származik. Azok a donorok előnyösek, akik HLA-A2-altípusba tartoznak.

A HLA-allélek epitóp-kötési típusainak megjósolása

25 A HLA I. osztályú kötődést mutató peptidszekvenciákat (nonamereket, dekamereket) a Parker-féle algoritmussal [Parker és mtsai. (1994)] (http://bimas.dcrt.nih.gov/mol-bio/hla_bind/) vagy a Rammensse-eljárással [ld. Rammensee és mtsai. (1997) és (1995)] (<http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/Scripts/MHCServer.dll/EpPredict.htm>) azonosítottuk.

A HLA II. osztályú kötődéssel jellemezhető peptidszekvenciákat (nonamereket) a Tepitope-algoritmus alkalmazásával [Sturniolo és mtsai. (1999)] jósoltuk meg.

CD8+ T-sejtes reakció

30 A CD8+ T-sejtvonalak létrehozására két stratégiát alkalmaztunk: egy peptidalapú módszert és egy teljes génen alapuló módszert. Mindkét megközelítési mód esetében szükség van arra, hogy a teljes hosszúságú cDNS megfelelő leolvasási fázisban, megfelelő hordozórendszerbe legyen klónozzható, és felhasználható legyen a HLA-kötő peptidek szekvenciájának megjósolására.

Peptidalapú módszer

Ebben az esetben a HLA-A2.1-peptidek szkrínelésére HLA-A2.1/Kb transzgénus egérmodellt alkalmaztunk. Röviden összefoglalva: a transzgénus egereket adjuvánssal elegyített HLA-A2-peptidekkel immunizáltunk, és a CD8-reakció indukálására képes peptideket (amit az impulzusszerűen peptiddel kezelt célsejtekben a hatékony lízis vagy γ -interferon-termelés alapján határoztunk meg) humán rendszerben további elemzésnek vetettük alá.

A FACS-analízissel CD8⁺ osztályozott T-sejtek stimulálása céljából a kiválasztott peptidekkel - Romani és mtsai. leírása szerint tenyésztett - impulzusszerűen humán dendritikus sejteket kezeltünk. Több hetes stimuláció után a CD8⁺ vonalakat először peptiddel pulzuskezelte autológ BLCL-sejteken (EBV-B transzformált sejtvonalak) teszteltük. A peptid megfelelő *in vivo* érési folyamatának igazolása céljából a CD8⁺ vonalakat cDNS-sel transzfektált tumorsejteken (HLA-A2-vel transzfektált LnCaP, Skov3 és CAMA tumorsejteken) teszteltük.

Teljes génen alapuló eljárás

A CD8⁺ T-sejtvonalakat génagyúval transzfektált dendritikus sejtekkel, retrovírussal transzdukált, B7.1-transzfektált fibroblasztokkal vagy - rekombináns himlővírussal [Kim és mtsai.] vagy adenovírussal [Butterfield és mtsai.] fertőzött - dendritikus sejtekkel indukáltuk és stimuláltuk. A vírusfertőzött sejtek - mivel az antigén nagy mennyiségben expresszálódik - nagyon hatékonyak az antigénhatású peptidek prezentálásában, azonban ezek a virális T-sejtvonalak túlszaporodásának elkerülése érdekében csupán egyszer alkalmazhatók.

A váltakozó stimulálást követően a CD8⁺ vonalakat cDNS-sel transzfektált tumorsejteken (ld. fentebb) teszteltük. A találmány szerinti antigén immunológiai érvényességének megerősítése céljából meghatároztuk a peptid psecifitását és azonosságát.

CD4⁺ T-sejtes reakció

A fentiekhez hasonlóan elemeztük a CD4⁺ T-sejtes immunreakciót is. A specifikus CD4⁺ T-sejteket olyan dendritikus sejtek alkalmazásával hoztuk létre, amelyek (a T-sejtek stimulálása céljából) rekombináns tisztított proteinnel vagy peptidekkel vannak feltöltve.

EredményekA) I. osztályú epitópok megjóslása a Parker-módszerrelA/1) Cripto-1 és cripto-3 I. osztályú epitópok

HLA-allél	Epitóp mérete	Kezdő pozíció	Szekvencia	Pontszám	Szekvencia száma
A68	Decamer	12	SVIWIMAI SK	240.000	SEQ ID NO:13
A68	Decamer	117	SVPHDTWL PK	120.000	SEQ ID NO:14
B2705	Nonamer	33	HQEFARPS R	100.000	SEQ ID NO:15
B2705	Nonamer	59	IRPRSSQR V	600.000	SEQ ID NO:16
B2705	Nonamer	72	IQHSKELNR	100.000	SEQ ID NO:17
B2705	Nonamer	103	GRNCEHDVR	1000.000	SEQ ID NO:18
B2705	Nonamer	110	VRKENCGSV	600.000	SEQ ID NO:19
B2705	Nonamer	138	LRCFPQAF L	2000.000	SEQ ID NO:20
B2705	Nonamer	161	SRTPELPP S	200.000	SEQ ID NO:21
B2705	Decamer	65	QRVPPMGI QH	200.000	SEQ ID NO:22
B2705	Decamer	79	NRTCCLNG GT	200.000	SEQ ID NO:23
B2705	Decamer	103	GRNCEHDVR K	2000.000	SEQ ID NO:93
B2705	Decamer	136	GQLRCFPQA F	100.000	SEQ ID NO:24
B2705	Decamer	161	SRTPELPPSA	200.000	SEQ ID NO:94
B5101	Decamer	143	QAFLPGCDGL	110.000	SEQ ID NO:25
B5102	Decamer	143	QAFLPGCDGL	302.500	SEQ ID NO:25
B5102	Decamer	150	DGLVMDEHL V	120.000	SEQ ID NO:26
B60	Nonamer	23	FELGLVAGL	325.000	SEQ ID NO:27
B60	Nonamer	76	KELNRTCCL	320.000	SEQ ID

5

					NO:28
B62	Nonamer	137	QLRCFPQAF	240.000	SEQ ID NO:29
B62	Decamer	136	GQLRCFPQAF	160.000	SEQ ID NO:24
B7	Nonamer	169	SARTTTFML	120.000	SEQ ID NO:30

A/2) Cripto-1-specifikus I. osztályú epitópok

HLA-allél	Epitóp mé- rete	Kezdő pozí- ció	Szekvencia	Pontszám	Szekvencia száma
A0201	Nonamer	5	KMARFSYSV	668.086	SEQ ID NO:31
A0201	Decamer	16	IMAIKVFEL	349.885	SEQ ID NO:32
A0201	Decamer	13	VIWIMAIKSV	310.361	SEQ ID NO:33
A0201	Decamer	175	FMLVGICLSI	128.242	SEQ ID NO:34
B2702	Nonamer	7	ARFSYSVIW	500.000	SEQ ID NO:35
B2702	Nonamer	3	CRKMARFSY	200.000	SEQ ID NO:36
B2702	Decamer	7	ARFSYSVIWI	300.000	SEQ ID NO:37
B2702	Decamer	37	ARPSRGYLA	200.000	SEQ ID NO:38
B2705	Nonamer	7	ARFSYSVIW	1000.000	SEQ ID NO:35
B2705	Nonamer	3	CRKMARFSY	1000.000	SEQ ID NO:36
B2705	Nonamer	170	ARTTTFMLV	600.000	SEQ ID NO:39
B2705	Nonamer	37	ARPSRGYLA	200.000	SEQ ID NO:40
B2705	Decamer	7	ARFSYSVIWI	3000.000	SEQ ID NO:37
B2705	Decamer	37	ARPSRGYLA	1000.000	SEQ ID NO:38
B2705	Decamer	3	CRKMARFSYS	200.000	SEQ ID NO:41
B4403	Decamer	34	QEFARPSRGY	120.000	SEQ ID NO:42

5

10

B5101	Nonamer	6	MARFSYSVI	286.000	SEQ ID NO:43
B5101	Decamer	169	SARTTTFMLV	110.000	SEQ ID NO:44
B5102	Nonamer	17	MAISKVFEL	150.000	SEQ ID NO:45
B5102	Nonamer	6	MARFSYSVI	100.000	SEQ ID NO:43
B5103	Nonamer	6	MARFSYSVI	100.000	SEQ ID NO:43
B5103	Decamer	169	SARTTTFMLV	121.000	SEQ ID NO:44
B7	Nonamer	36	FARPSRGYL	180.000	SEQ ID NO:46

A/3) Cripto-3-specifikus I. osztályú epitópok

15

HLA-allél	Epitóp mé- rete	Kezdő pozí- ció	Szekvencia	Pontszám	Szekvencia száma
A0201	Nonamer	5	KMVRFSYSV	668.086	SEQ ID NO:47
A0201	Nonamer	89	CMLESFCAC	103.417	SEQ ID NO:48
A0201	Decamer	16	IMAISKAFEL	152.124	SEQ ID NO:49
A0201	Decamer	175	FMLAGICLSI	128.242	SEQ ID NO:50
B2702	Nonamer	7	VRFSYSVIW	500.000	SEQ ID NO:51
B2702	Nonamer	3	CRKMVRFSY	200.000	SEQ ID NO:52
B2702	Decamer	7	VRFSYSVIWI	300.000	SEQ ID NO:53
B2702	Decamer	37	ARPSRGDLAF	200.000	SEQ ID NO:54
B2705	Nonamer	3	CRKMVRFSY	1000.000	SEQ ID NO:52
B2705	Nonamer	7	VRFSYSVIW	1000.000	SEQ ID NO:51
B2705	Nonamer	37	ARPSRGDLA	200.000	SEQ ID NO:55
B2705	Nonamer	170	ARTTTEMLA	200.000	SEQ ID NO:56

B2705	Decamer	7	VRFSYSVIWI	3000.000	SEQ ID NO:53
B2705	Decamer	37	ARPSRGDLAF	1000.000	SEQ ID NO:54
B2705	Decamer	59	IRPRSSQRL	600.000	SEQ ID NO:57
B2705	Decamer	3	CRKMVRFSYS	200.000	SEQ ID NO:58
B2705	Decamer	65	QRLPMGIQH	200.000	SEQ ID NO:59
B5101	Nonamer	60	RPRSSQRL	120.000	SEQ ID NO:60
B5102	Nonamer	17	MAISKAFEL	150.000	SEQ ID NO:61
B7	Nonamer	60	RPRSSQRL	800.000	SEQ ID NO:60
B7	Nonamer	36	FARPSRGDL	180.000	SEQ ID NO:62

NB: A pontszám az e szekvencia-részletet tartalmazó molekula disszociációs felezési idejének
becslése

B) I. osztályú epitópok megjósolása Rammensee-módszerrel

B/1) Cripto-1 és -3 I. osztályú epitópok

HLA-allél	Epitóp mé- rete	Kezdő pozí- ció	Szekvencia	Pontszám	Szekvencia száma
A26	Nonamer	179	GICLSIQSY	27	SEQ ID NO:63
A26	Decamer	27	LVAGLGHQE F	25	SEQ ID NO:64
A26	Decamer	121	DTWLPPKCSL	25	SEQ ID NO:65
A3	Nonamer	58	AIRPRSSQR	29	SEQ ID NO:66
A3	Nonamer	13	VIWIMAISK	24	SEQ ID NO:67
A3	Decamer	12	SVIWIMAISK	29	SEQ ID NO:13
A3	Decamer	117	SVPHTWLP K	24	SEQ ID NO:14

B2705	Nonamer	103	GRNCEHDVR	25	SEQ ID NO:18
B2705	Nonamer	138	LRCFPQAFL	24	SEQ ID NO:20

5

B/2) Cripto-1-specifikus I. osztályú epitópok

HLA-allél	Epitóp mé- rete	Kezdő pozí- ció	Szekvencia	Pontszám	Szekvencia száma
A0201	Nonamer	83	CLNGGTCML	27	SEQ ID NO:68
A0201	Nonamer	5	KMARFSYSV	25	SEQ ID NO:31
A0201	Decamer	16	IMAI SKVFEL	28	SEQ ID NO:32
A0201	Decamer	13	VIWIMAI SKV	26	SEQ ID NO:33
A26	Nonamer	35	EFARPSRGY	24	SEQ ID NO:69
A3	Nonamer	66	RVPPMGIQH	27	SEQ ID NO:70
A3	Nonamer	21	KVFELGLVA	24	SEQ ID NO:71
B08	Nonamer	17	MAI SKVFEL	26	SEQ ID NO:45
B5101	Nonamer	6	MARFSYSVI	25	SEQ ID NO:43

B/3) Cripto-3-specifikus I. osztályú epitópok

HLA-allél	Epitóp mé- rete	Kezdő pozí- ció	Szekvencia	Pontszám	Szekvencia száma
A0201	Nonamer	83	CLNGGTCML	27	SEQ ID NO:68
A0201	Nonamer	176	MLAGICLSI	25	SEQ ID NO:72
A0201	Decamer	16	IMAI SKAFEL	24	SEQ ID NO:49
A3	Nonamer	66	RVLPMGIQH	29	SEQ ID NO:73
B0702	Nonamer	60	RPRSSQ RVL	24	SEQ ID NO:60
B08	Nonamer	17	MAI SKAFEL	25	SEQ ID NO:61

C) II. osztályú epitópok megjóslása Tepitope-eljárással

C/1) Cripto-1 és cripto-3 II. osztályú epitópok

HLA-allél	Epitóp mé- rete	Kezdő pozíció	Szekvencia	Pontszám	Szekvencia száma
DRB1*0102	Nonamer	70	MGIQHSEL	1.8	SEQ ID NO:74
DRB1*0301	Nonamer	152	LVMDEHLVA	5.9	SEQ ID NO:75
DRB1*0301	Nonamer	158	LVASRTPEL	4.3	SEQ ID NO:76
DRB1*0401	Nonamer	152	LVMDEHLVA	3.2	SEQ ID NO:75
DRB1*0402	Nonamer	59	IRPRSSQRV	4.9	SEQ ID NO:16
DRB1*0703	Nonamer	11	YSVIWIMAI	6	SEQ ID NO:77
DRB1*0703	Nonamer	158	LVASRTPEL	5.7	SEQ ID NO:76
DRB1*0802	Nonamer	59	IRPRSSQRV	1.8	SEQ ID NO:16
DRB1*0802	Nonamer	123	WLPKKCSLC	2.3	SEQ ID NO:78
DRB1*0804	Nonamer	59	IRPRSSQRV	2.8	SEQ ID NO:16
DRB1*0806	Nonamer	59	IRPRSSQRV	3.1	SEQ ID NO:16
DRB1*1101	Nonamer	11	YSVIWIMAI	2.8	SEQ ID NO:77
DRB1*1101	Nonamer	152	LVMDEHLVA	2.2	SEQ ID NO:75
DRB1*1102	Nonamer	152	LVMDEHLVA	2.4	SEQ ID NO:75
DRB1*1104	Nonamer	25	LGLVAGLGH	2.8	SEQ ID NO:79
DRB1*1104	Nonamer	152	LVMDEHLVA	3.2	SEQ ID NO:75
DRB1*1106	Nonamer	25	LGLVAGLGH	2.8	SEQ ID NO:79
DRB1*1106	Nonamer	152	LVMDEHLVA	3.2	SEQ ID NO:75
DRB1*1107	Nonamer	46	FRDDSIWPQ	2.8	SEQ ID NO:80
DRB1*1107	Nonamer	152	LVMDEHLVA	5.9	SEQ ID NO:75
DRB1*1107	Nonamer	158	LVASRTPEL	3.3	SEQ ID

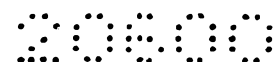
					NO:76
DRB1*1305	Nonamer	11	YSVIWIMAI	3.7	SEQ ID NO:77
DRB1*1307	Nonamer	11	YSVIWIMAI	1.2	SEQ ID NO:77
DRB1*1501	Nonamer	138	LRCFPQAFL	4.3	SEQ ID NO:20
DRB1*1501	Nonamer	152	LVMDEHLVA	4.5	SEQ ID NO:75
DRB1*1502	Nonamer	152	LVMDEHLVA	3.5	SEQ ID NO:75
DRB5*0101	Nonamer	13	VIWIMAISK	5.3	SEQ ID NO:67

C/2) Cripto-3-specifikus II. osztályú epitópok

HLA-allél	Epitóp mé- rete	Kezdő pozíció	Szekvencia	Pontszám	Szekvencia száma
DRB1*0101	Nonamer	15	WIMAISKVF	1.3	SEQ ID NO:81
DRB1*0102	Nonamer	176	MLVGICLSI	1.8	SEQ ID NO:82
DRB1*0102	Nonamer	178	VGICLSIQS	1.7	SEQ ID NO:83
DRB1*0301	Nonamer	17	MAISKVFEL	3.9	SEQ ID NO:45
DRB1*0401	Nonamer	178	VGICLSIQS	2.8	SEQ ID NO:83
DRB1*0402	Nonamer	178	VGICLSIQS	4.2	SEQ ID NO:83
DRB1*0404	Nonamer	14	IWIMAISKV	2.9	SEQ ID NO:84
DRB1*0404	Nonamer	177	LVGICLSIQ	3.3	SEQ ID NO:85
DRB1*0404	Nonamer	178	VGICLSIQS	3.8	SEQ ID NO:83
DRB1*0405	Nonamer	175	FMLVGICLS	3.2	SEQ ID NO:86
DRB1*0405	Nonamer	177	LVGICLSIQ	3.1	SEQ ID NO:85
DRB1*0405	Nonamer	178	VGICLSIQS	2.8	SEQ ID NO:83
DRB1*0703	Nonamer	15	WIMAISKVF	5.7	SEQ ID

000000

					NO:81
DRB1*0703	Nonamer	17	MAISKVFEL	7.6	SEQ ID NO:45
DRB1*0703	Nonamer	176	MLVGICLSI	5	SEQ ID NO:82
DRB1*0801	Nonamer	175	FMLVGICLS	3.8	SEQ ID NO:86
DRB1*0802	Nonamer	175	FMLVGICLS	3.8	SEQ ID NO:86
DRB1*0804	Nonamer	175	FMLVGICLS	2.8	SEQ ID NO:86
DRB1*1101	Nonamer	175	FMLVGICLS	3.9	SEQ ID NO:86
DRB1*1101	Nonamer	178	VGICLSIQS	2.4	SEQ ID NO:83
DRB1*1104	Nonamer	175	FMLVGICLS	2.9	SEQ ID NO:86
DRB1*1104	Nonamer	177	LVGICLSIQ	2.6	SEQ ID NO:85
DRB1*1104	Nonamer	178	VGICLSIQS	3.4	SEQ ID NO:83
DRB1*1106	Nonamer	175	FMLVGICLS	2.9	SEQ ID NO:86
DRB1*1106	Nonamer	177	LVGICLSIQ	2.6	SEQ ID NO:85
DRB1*1106	Nonamer	178	VGICLSIQS	3.4	SEQ ID NO:83
DRB1*1107	Nonamer	17	MAISKVFEL	2.9	SEQ ID NO:45
DRB1*1107	Nonamer	177	LVGICLSIQ	3.6	SEQ ID NO:85
DRB1*1107	Nonamer	178	VGICLSIQS	3	SEQ ID NO:83
DRB1*1302	Nonamer	15	WIMAIKVF	3.3	SEQ ID NO:81
DRB1*1302	Nonamer	175	FMLVGICLS	3	SEQ ID NO:86
DRB1*1305	Nonamer	15	WIMAIKVF	3.1	SEQ ID NO:81
DRB1*1305	Nonamer	175	FMLVGICLS	4.3	SEQ ID NO:86
DRB1*1307	Nonamer	175	FMLVGICLS	3.9	SEQ ID NO:86
DRB1*1307	Nonamer	177	LVGICLSIQ	1.6	SEQ ID



					NO:85
DRB1*1501	Nonamer	6	MARFSYSVI	4.5	SEQ ID NO:43
DRB1*1501	Nonamer	176	MLVGICLSI	4.1	SEQ ID NO:82
DRB1*1502	Nonamer	6	MARFSYSVI	3.5	SEQ ID NO:43
DRB5*0101	Nonamer	15	WIMAISKVF	4.1	SEQ ID NO:81

C/2) Cripto-3-specifikus II. osztályú epitópok

HLA-allél	Epitóp mé- rete	Kezdő pozíció	Szekvencia	Pont- szám	Szekvencia száma
DRB1*0101	Nonamer	15	WIMAISKAF	1.3	SEQ ID NO:87
DRB1*0102	Nonamer	6	MVRFSYSVI	1.4	SEQ ID NO:88
DRB1*0102	Nonamer	17	MAISKAFEL	1.6	SEQ ID NO:61
DRB1*0401	Nonamer	7	VRFSYSVIW	2.9	SEQ ID NO:51
DRB1*0401	Nonamer	175	FMLAGICLS	2.7	SEQ ID NO:89
DRB1*0402	Nonamer	67	VLPMGIQHS	3.6	SEQ ID NO:90
DRB1*0404	Nonamer	6	MVRFSYSVI	2.5	SEQ ID NO:88
DRB1*0404	Nonamer	14	IWIMAISKA	3.6	SEQ ID NO:91
DRB1*0404	Nonamer	67	VLPMGIQHS	3.5	SEQ ID NO:90
DRB1*0405	Nonamer	175	FMLAGICLS	2.7	SEQ ID NO:89
DRB1*0703	Nonamer	7	VRFSYSVIW	6.5	SEQ ID NO:51
DRB1*0703	Nonamer	15	WIMAISKAF	5.7	SEQ ID NO:87
DRB1*0703	Nonamer	17	MAISKAFEL	7.5	SEQ ID NO:61
DRB1*0801	Nonamer	16	IMAIKAFE	3	SEQ ID NO:92
DRB1*0801	Nonamer	175	FMLAGICLS	3.5	SEQ ID NO:89

DRB1*0802	Nonamer	67	VLPMGIQHS	1.9	SEQ ID NO:90
DRB1*0802	Nonamer	175	FMLAGICLS	3.5	SEQ ID NO:89
DRB1*0804	Nonamer	67	VLPMGIQHS	2.9	SEQ ID NO:90
DRB1*0804	Nonamer	175	FMLAGICLS	2.5	SEQ ID NO:89
DRB1*0806	Nonamer	16	IMAIKAFE	4	SEQ ID NO:92
DRB1*1101	Nonamer	175	FMLAGICLS	3.5	SEQ ID NO:89
DRB1*1102	Nonamer	67	VLPMGIQHS	3.1	SEQ ID NO:90
DRB1*1102	Nonamer	175	FMLAGICLS	2.5	SEQ ID NO:89
DRB1*1107	Nonamer	7	VRFSYSVIW	2.8	SEQ ID NO:51
DRB1*1301	Nonamer	67	VLPMGIQHS	3.5	SEQ ID NO:90
DRB1*1302	Nonamer	15	WIMAIKAF	3.3	SEQ ID NO:87
DRB1*1302	Nonamer	175	FMLAGICLS	3.9	SEQ ID NO:89
DRB1*1305	Nonamer	15	WIMAIKAF	3.1	SEQ ID NO:87
DRB1*1305	Nonamer	175	FMLAGICLS	3.9	SEQ ID NO:89
DRB1*1307	Nonamer	67	VLPMGIQHS	1.5	SEQ ID NO:90
DRB1*1307	Nonamer	175	FMLAGICLS	3.5	SEQ ID NO:89
DRB1*1501	Nonamer	6	MVRFSYSVI	6.6	SEQ ID NO:88
DRB1*1502	Nonamer	6	MVRFSYSVI	5.6	SEQ ID NO:88
DRB5*0101	Nonamer	15	WIMAIKAF	4.1	SEQ ID NO:87

5. példa

A cripto-vaksinák által indukált humorális reakció tumorellenes hatása

A cripto-specifikus humorális reakciónak a cripto-protein rákos esetekben kifejtett patofiziológiai aktivitásaira gyakorolt gátló hatását különféle standard *in vitro* tesztek alkalmazásával vizsgálhatjuk. Ilyen *in vitro* teszteként, többek között, sejtszaporodás-gátlási teszt, sejtmozgékonyosság-gátlási teszt, kemotaxis-gátlási teszt, extracelluláris mátrix-proteinen (ECM) keresztüli invázió gátlási tesztje és sejtszaporodási szignáltranszdukciós reakcióút gátlási tesztje alkalmazható. Ezekben az *in vitro* tesztekben (melyekkel a cripto-proteint termelő sejtvonalakra gyakorolt cripto-közvetítette biológiai hatások mérhetők) az adjuvánssal kombinált cripto-peptidekkel vagy cripto-proteinnel (vagy cripto-proteint kódoló plazmid-DNS-sel vagy virális hordozórendszerrel, pl. adenovírus-vektorral) immunizált állatokból származó szérum hatásait vizsgálhatjuk. E tesztekkel párhuzamosan, negatív kontrollként az ugyanazon állatokból immunizálás előtt vett szérum hatásait tesztelhetjük. A szóban forgó tesztekben, többek között, a következő sejtvonalak alkalmazhatók: cripto-proteint termelő humán tumorsejtek (pl. GEO-sejtek, NTERA2-sejtek vagy CRL-5815-sejtvonal), valamint - a cripto-proteint eredendően túlzott mértékben termelő - egéregedetű tumorsejtek. Például, a GEO- és NTERA2-sejtek *in vitro* szaporodásának gátlását korábban a cripto-mRNS transzlációjának gátlására tervezett antiszensz oligonukleotidokkal végzett kezeléssel demonstrálták [ld. Baldassare és mtsai. (1996); Ciardiello és mtsai. (1994); Alper és mtsai. (2000)].

5.1. Immunizálási séma

Az egerek és nyulak immunizálását a 0., 14. és 21. napon, az adjuvánssal kombinált protein vagy peptidek talppárnába történő injektálásával; cripto-proteint kódoló plazmid-DNS génágyú alkalmazásával végzett intradermális injektálásával; vagy cripto-proteint kódoló virális vektor (pl. adenovírus-vektor) intradermális injektálásával hajtottuk végre.

5.2. Sejtproliferáció-gátlási teszt

Az immunizált állatokból vérsavót gyűjtöttünk, és a vérsavó-mintákat különböző hígításokban 96 üregű tálcákra szélesztett sejtek tenyésztő tápközegéhez adtuk. Hasonlóan - negatív kontrollként -, ugyanezen állatokból immunizálás előtt vett vérsavót adtunk a sejtekhez. A sejteket 3-7 napig tenyésztettük, és a proliferációt standard módszerekkel (például, ³H-timidin-beépülési teszttel, MTT-teszttel, kristályibolya-festéssel vagy lágy agar tápközegben kolóniaszámlálással) mértük.

5.3. Sejtinvázió-, motilitás- és kemotaxis-gátlási tesztek

Az immunizált állatokból immunizálás után, illetve immunizálás előtt vérsavót gyűjtöttünk, és különböző hígításokban a standard inváziós, motilitási és kemotaxis tesztekben alkalmazott sejtszuspenziókhoz adtuk. A cripto-közvetítette invázió, motilitás és kemotaxis gátlása, például, de nem kizárólag, kereskedelmi forgalomban beszerezhető, "matrigel" inszerteket tartalmazó Falcon-rekeszek [Collaborative Research), agarózos motilitási csepp-teszt [Yamamoto és mtsai. (1990)] és kereskedelmi forgalomban beszerezhető Boyden-apparátus (Neuro Probe) alkalmazásával tesztelhető.

5.4. Szignáltranszdukció-gátlási teszt

Az immunizált állatokból immunizálás után, illetve immunizálás előtt vérsavót gyűjtöttünk, és különböző hígításokban cripto-proteint termelő tumorsejtek tenyésztéséhez adtuk. Ezt követően a sejtek tenyésztő tápközegéhez exogén cripto-proteint vagy - ELISA-teszttel a legnagyobb cripto-koncentrációjúnak bizonyult - humán vérsavót vagy tejet [Bianco és mtsai. (2001)] adtunk. Különböző időtartamú inkubálások után a sejteket betakarítottuk, és immunblot-analízis elvégzése céljából standard módszerekkel feldolgoztuk. A cripto-stimulált sejtekben a proliferációban szerepet játszó különféle, kulcsfontosságú szignáltranszdukciós reakcióutak foszforiláltsági állapotát az immunizálás előtt, illetve után gyűjtött vérsavók jelenlétében értékeljük. Például, az erbB-4-protein és a mitogénaktiválta protein (MAP) kinázcsalád tagjainak (pl. ERK1, ERK2 és P38) tirozin-foszforiláltsági állapota az ezen enzimek foszforilált, aktív alakját felismerő antitestekkel végzett immunblot-analízissel határozható meg [ld. Bianco és mtsai. (1999); Paine és mtsai. (2000)].

6. példa

A cripto-vakcinák által indukált immunreakció *in vivo* tumorelles hatásának vizsgálata állatmodellekben

A humán cripto-proteint, cripto-peptideket vagy cripto-gént tartalmazó vakcinák profilaktikus, illetve terápiás hatékonyságát cripto-proteint termelő, egéredetű szingénes tumorsejtvonallal immunpróbázott egerekben értékeltük. Tumorsejtvonalként humán cripto-génnel transzfektált egéredetű tumorsejtvonalat alkalmazhatunk. Például, transzfektált tumorsejtvonalként humán cripto-génnel transzfektált TC1-sejtvonalat alkalmazunk. Más részről, a humán cripto-protein és egéredetű homológja közötti nagyfokú hasonlóság azt sugallja, hogy a humán vakcina által indukált keresztreaktív immunreakciók védelmet biztosíthatnak az egéredetű cripto-proteint termelő tumorokkal szemben. A cripto-gén (TDGF-1) valójában

egy 171 aminosavas proteint kódol, amely humán megfelelőjével 93 %-ban azonos [Ligouri és mtsai. (1996)]. Ilyenformán, az egerekben a humán cripto-vakcina védekezést nyújt az egérszervi eredetű tumorról végzett immunpróbával vagy a spontán kialakuló - a cripto-proteint endogén módon túltermelő - tumorról szemben. E tekintetben, kimutatták, hogy a transzgenikus egerekben spontán kifejlődő - és több különböző onkogén (így pl. az MMTV-polioma vírus közepes T-antigénje, MMTV-c-ErbB2 és MT-hTGF-alfa) túlzott mértékű termelésére tervezett - tumork a cripto-proteint is túlzott mértékben termelik [ld. Kenney és mtsai. (1996); Niemeyer és mtsai. (1999)].

Más módon, a tumort hordozó egerek - a szingénikus génnel történő vakcinálás céljából, az egérszervi eredetű tumornövekedéssel szembeni védekezés kialakítása érdekében - egérszervi eredetű cripto-proteint kódoló plazmid-DNS-sel vagy virális hordozórendszerrel (pl. adenovírus-vektorral) vakcinálhatók.

6.1. A profilaktikus hatékonyság kísérleti modellje

Az egereket a 0. és 14. napon - a tumorról végzett immunpróba előtt - adjuvánssal kombinált 5 µg cripto-protein talppárnába történő injekciójával; cripto-proteint kódoló plazmid-DNS génanyag technológia alkalmazásával végzett intradermális injekciójával; vagy cripto-proteint kódoló virális vektor (pl. adenovírus-vektor) intradermális injekciójával vakcináltuk. A vakcinálás után egy vagy két héttel immunkompetens C57BL/6-egerek lágyékába szubkután 10^6 TC1-CR-1-sejtet (humán cripto-proteint termelő tumorsejtek) injektáltunk. A tumornövekedést *in vivo* az egyes tumork - tumoros immunpróba után több héten keresztül végzett - heti kétszeri mérésével követhetjük nyomon.

Más részről, a megelőzési célú vakcinálás hatékonysága - kitapintható tumor kialakulása előtt a cripto-vakcinák bármelyik fajtájával több alkalommal immunizált transzgenikus egerekben - a cripto-proteint termelő spontán tumork kialakulásának gátlása alapján értékelhető.

6.2. A terápiás hatékonyság kísérleti modellje

immunkompetens C57BL/6-egerek lágyékába szubkután 10^6 TC1-CR-1-sejtet (humán cripto-proteint termelő tumorsejtek) injektáltunk. Az egereket a 7. és 14. napon - a tumorról végzett immunpróba után - adjuvánssal kombinált 5 µg cripto-protein talppárnába történő injekciójával; cripto-proteint kódoló plazmid-DNS génanyag technológia alkalmazásával végzett intradermális injekciójával; vagy cripto-proteint kódoló virális vektor (pl. adenovírus-vektor) intradermális injekciójával vakcináltuk. A tumornövekedést *in vivo* az egyes tumork heti kétszeri mérésével követtük nyomon. A második immunizálás után 1-4 héttel csoportonként több egeret leöltünk, lépsejtjeiket, nyirokcsomóikat és vérsavójukat kigyűjtöttük, és ezeket - a

cripto-specifikus immunreakció indukálása és a tumorellenes hatás közötti összefüggés megállapítása céljából - az immunreakciók elemzésére használtuk fel. Az immunizálással indukált cripto-specifikus immunreakció vizsgálata az antitest-titerek, az antitest izotípusos profilja, a $CD4^+$ T-sejt-proliferációs reakció és a CTL $CD8^+$ T-sejt-reakciók (ideértve a citokin-termelődést és a cripto-proteint termelő célsejtek elleni lízises aktivitást) mérésével, illetve elemzésével hajtható végre. Valamennyi tesztet szokványos eljárással végeztük.

Hasonló kísérletet hajthatunk végre egérszülők cripto-proteint túlzott mennyiségben termelő, egéredetű, transzplantálható emlőtumor-sejtvonalakkal végzett immunpróbájával. Ezek a sejtek több különböző onkogént (így pl. az MMTV-polioma vírus közepes T-antigénjét, MMTV-c-ErbB2-t és MT-hTGF-alfát) túlzott mennyiségben termelő, transzgénis egerekben spontán kialakuló tumorokból hozhatók létre [Niemeyer és mtsai. (1999)].

Hivatkozások jegyzéke

- Alper O, De Santis ML, Stromberg K, Hacker NF, Cho-Chung YS, Salomon DS (2000) Anti-sense suppression of epidermal growth factor receptor expression alters cellular proliferation, cell-adhesion and tumorigenicity in ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 88: 566-574
- Baldassarre G, Bianco C, Tortora G, Ruggiero A, Moasser M, Dmitrovsky E, Bianco AR, Ciardiello F (1996) Transfection with a CRIPTO anti-sense plasmid suppresses endogenous CRIPTO expression and inhibits transformation in a human embryonal carcinoma cell line. *Int J Cancer* 66: 538-543
- Bianco C, Kannan S, De Santis M, Seno M, Tang CK, Martinez-Lacaci I, Kim N, Wallace-Jones B, Lippman ME, Ebert AD, Wechselberger C, Salomon DS (1999) Cripto-1 indirectly stimulates the tyrosine phosphorylation of erb B-4 through a novel receptor. *J Biol Chem* 274: 8624-8629
- Bianco C, Wechselberger C, Ebert A, Khan NI, Sun Y, Salomon DS (2001) Identification of Cripto-1 in human milk. *Breast Cancer Res Treat* 66: 1-7
- Butterfield LH, Jilani SM, Chakraborty NG, Bui LA, Ribas A, Disette VB, Lau R, Gamradt SC, Glaspy JA, McBride WH, Mukherji B, Economou JS. (1998) Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transduced with a MART-1 adenovirus. *J Immunol.* 161: 5607-13.
- Ciardiello F, Tortora G, Bianco C, Selvam MP, Basolo F, Fontanini G, Pacifico F, Normanno N, Brandt R, Persico MG (1994) Inhibition of CRIPTO expression and tumorigenicity in human colon cancer cells by antisense RNA and oligodeoxynucleotides. *Oncogene* 9: 291-298
- Kenney NJ, Smith GH, Maroulakou IG, Green JH, Muller WJ, Callahan R, Salomon DS, Dickson RB (1996) Detection of amphiregulin and Cripto-1 in mammary tumors from transgenic mice. *Mol Carcinog* 15: 44-56
- Kim CJ, Prevette T, Cormier J, Overwijk W, Roden M, Restifo NP, Rosenberg SA, Marincola FM. (1997) Dendritic cells infected with poxviruses encoding MART-1/Melan A sensitize T lymphocytes in vitro. *J Immunother.* 20:276-286.
- Liguori G, Tucci M, Montuori N, Dono R, Lago CT, Pacifico F, Armenante F, Persico MG (1996) Characterization of the mouse Tdgf1 gene and Tdgf pseudogenes. *Mamm Genome* 7: 344-348
- Niemeyer CC, Spencer-Dene B, Wu JX, Adamson ED (1999) Preneoplastic mammary tumor markers: Cripto and Amphiregulin are overexpressed in hyperplastic stages of tumor progression in transgenic mice. *Int J Cancer* 81: 588-591

Paine E, Palmantier R, Akiyama SK, Olden K, Roberts JD (2000) Arachidonic acid activates mitogen-activated protein (MAP) kinase- activated protein kinase 2 and mediates adhesion of a human breast carcinoma cell line to collagen type IV through a p38 MAP kinase- dependent pathway. *J Biol Chem* 275: 11284-11290

Parker K, Bednarek M, Coligan J (1994). Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* 152:163.

Rammensee, Bachmann, Stevanovic (1997). MHC ligands and peptide motifs. *Landes Bioscience.*

Rammensee, Friede, Stevanovic (1995). MHC ligands and peptide motifs: 1st listing, *Immunogenetics* 41, 178-228.

Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. (1994) Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 180:83-93.

Sturniolo T, Bono E, Ding J, Raddrizzani L, Tuereci O, Sahin U, Braxenthaler M, Gallazzi F, Protti MP, Sinigaglia F, Hammer J. (1999) Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol.* 17: 555-61.

Yamamoto T, Varani J, Soong HK, Lichter PR (1990) Effects of 5-fluorouracil and mitomycin C on cultured rabbit subconjunctival fibroblasts. *Ophthalmology* 97: 1204-1210

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Cripto-poliipeptid immunogén fragmense, amely egy, a 3. vagy 4. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó, teljes hosszúságú poliipeptiddel reagáló antitesttel és/vagy T-sejttel
5 immunológiailag reaktív, és amely legalább 20, egymással szomszédos aminosavból áll és a 11. vagy 12. azonosítószámú szekvencia legalább egyikét tartalmazza, és szekvenciája nem azonos a 3. vagy 4. azonosítószámú szekvencia egészével.
2. Az 1. igénypont szerinti immunogén fragmens, amely a 13-94. azonosítószámú szekvenciák közül egyet vagy többet is tartalmaz.
- 10 3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti immunogén fragmens, amely egy nagyobb fúziós protein részét képezi.
4. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti immunogén fragmens, amely kémiai hordozó-proteinhez van konjugálva.
- 15 5. Izolált polinukleotid, amely 1-4. igénypontok bármelyike szerinti immunogén fragmenst kódol.
6. Expressziós vektor, amely - expressziós szabályozószekvenciához működőképesen kapcsolva - 5. igénypont szerinti izolált polinukleotidot tartalmaz.
7. Rekombináns virális vagy bakteriális célbajuttató rendszer, amely 5. igénypont szerinti izolált polinukleotidot tartalmaz.
- 20 8. Gazdasejt, amely 6. igénypont szerinti expressziós vektorral, 7. igénypont szerinti rekombináns célbajuttató rendszerrel vagy 5. igénypont szerinti izolált polinukleotiddal van transzformálva vagy transzfektálva.
9. Eljárás tumorproteinre specifikus T-sejtek serkentésére és/vagy szaporítására, *azzal jellemezve*, hogy T-sejteket a következő komponensek legalább egyikével érintkeztetünk:
25 (a) 1-4. igénypontok bármelyike szerinti immunogén fragmens;
(b) a 3. vagy 4. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó poliipeptid;
(c) 5. igénypont szerinti polinukleotid; és
(d) antigénprezentáló sejt, amely 1-4. igénypontok bármelyike szerinti immunogén fragmenst vagy a 3. vagy 4. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó poliipeptidet expresszál.
- 30 10. Izolált T-sejt-populáció, amely 9. igénypont szerinti eljárással létrehozott T-sejtekből áll.
11. Immunogén készítmény, amely első komponenst és második komponenst tartalmaz, mely első komponens fiziológiailag elfogadható hordozó, immunstimuláns és/vagy

adjuváns, a második komponens pedig a következők bármelyike:

(a) polipeptid, amely a 3. vagy 4. azonosítószámú szekvencia legalább tíz, egymással szomszédos aminosavából álló aminosav-szekvenciát tartalmaz;

(b) a 3. vagy 4. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó polipeptid vagy heterológ fúziós változata;

(c) 1-4. igénypontok bármelyike szerinti immunogén cripto-polipeptid-fragmens;

(d) izolált polinukleotid, amely az 1. vagy 2. azonosítószámú polinukleotid-szekvencia legalább 20 egymással szomszédos nukleotidjából álló szekvenciát tartalmaz;

(e) az 1. vagy 2. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó polinukleotid vagy degenerált változatai;

(f) a 3. vagy 4. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó proteinnel reagálóképes anti-test;

(g) 10. igénypont szerinti T-sejt-populáció; és

(h) antigénprezentáló sejt, amely (a) vagy (b) pont szerinti polipeptidet vagy 1-4. igénypontok bármelyike szerinti immunogén fragmenst expresszál.

12. A 11. igénypont szerinti immunogén készítmény, amely immunstimulánsként TH-1-indukáló adjuvánszt tartalmaz.

13. A 12. igénypont szerinti immunogén készítmény, amely TH-1-indukáló adjuvánsként 3D-MPL-t, QS21-et, QS21 és koleszterin elegyét, CpG-oligonukleotidot vagy a felsoroltak közül kettő vagy több kombinációját tartalmazza.

14. A 11-13. igénypontok bármelyike szerinti immunogén készítmény, immunreakció stimulálására történő alkalmazásra.

15. A 11-13. igénypontok bármelyike szerinti immunogén készítmény, rák kezelésére történő alkalmazásra.

16. A 11. igénypont (a)-(c) pontjainak bármelyike szerinti szerinti polipeptid, a 11. igénypont (d) vagy (e) pontja szerinti polinukleotid és/vagy a 2. igénypont szerinti polipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejt, az alábbi lépések szerinti eljárásban, rák kialakulásának gátlására történő alkalmazásra:

(a) egy páciensből izolált CD4+ és/vagy CD8+ T-sejteket a következő komponensek legalább egyikével inkubálunk, oly módon, hogy T-sejt-proliferáció következzen be: (i) a 11. igénypont (a)-(c) pontjainak bármelyike szerinti polipeptid; (ii) a 11. igénypont (d) vagy (e) pontja szerinti polinukleotid; vagy (iii) 2. igénypont szerinti polipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejt; és

(b) a proliferálódott T-sejtek hatásos mennyiségét beadjuk a páciensnek, miáltal gátoljuk a rák kialakulását a páciensben.

17. A 9-11. igénypontok bármelyike szerinti immunogén készítmény, gyógyászatban történő alkalmazásra.

5 18. A 9-11. igénypontok bármelyike szerinti immunogén készítmény cripto-antigént termelő tumorok kezelésére történő alkalmazásra.

19. A következő komponensek bármelyikének alkalmazása cripto-antigént termelő tumorok kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására:

10 (a) polipeptid, amely a 3. vagy 4. azonosítószámú szekvencia legalább tíz, egymással szomszédos aminosavából álló aminosav-szekvenciát tartalmaz;

(b) a 3. vagy 4. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó polipeptid vagy heterológ fúziós változata;

(c) 1-4. igénypontok bármelyike szerinti immunogén cripto-polipeptid-fragmens;

15 (d) izolált polinukleotid, amely az 1. vagy 2. azonosítószámú polinukleotid-szekvencia legalább 20 egymással szomszédos nukleotidjából álló szekvenciát tartalmaz;

(e) az 1. vagy 2. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó polinukleotid vagy degenerált változata;

(f) a 3. vagy 4. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó proteinnel reagálóképes anti-test;

20 (g) 10. igénypont szerinti T-sejt-populáció; vagy

(h) antigénprezentáló sejt, amely (a) vagy (b) pont szerinti polipeptidet vagy 1-4. igénypontok bármelyike szerinti immunogén fragmenst expresszál.

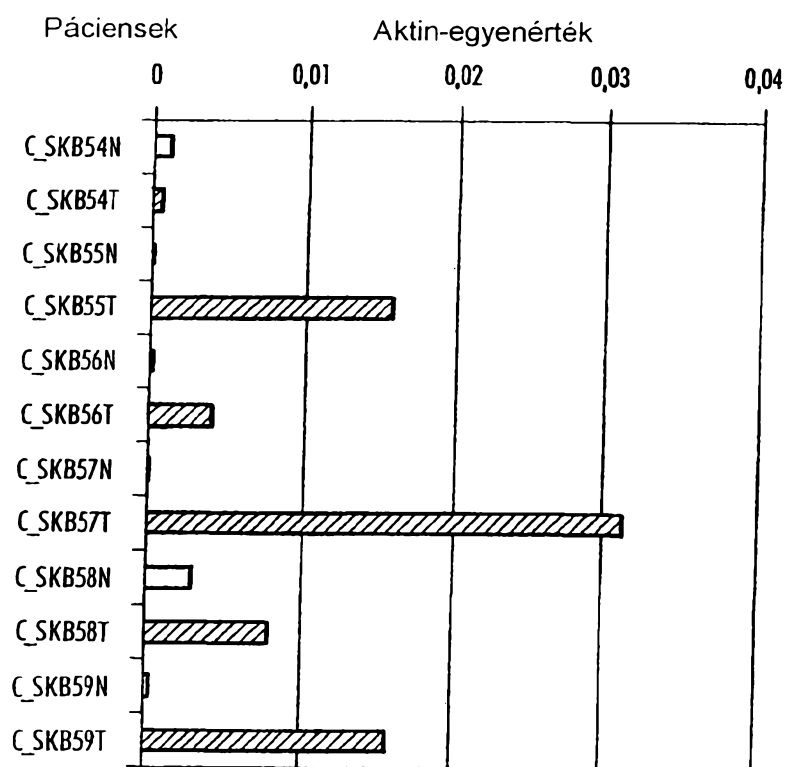
25 20. Eljárás 11-13. igénypontok bármelyike szerinti immunogén készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a 11. igénypont (a)-(c) pontjainak bármelyike szerinti polipeptidet vagy annak 1-4. igénypontok bármelyike szerinti immunogén fragmensét, vagy a 11. igénypont (d) vagy (e) pontja szerinti polinukleotidot megfelelő adjuvánssal, diluendummal vagy egyéb, gyógyászatilag elfogadható hordozóval elegyítjük.

30 21. Eljárás a 11. igénypont (a)-(c) pontjainak bármelyike szerinti polipeptid vagy annak 1-4. igénypontok bármelyike szerinti immunogén fragmense előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 8. igénypont szerinti gazdasejtet a polipeptid termelődésére alkalmas körülmények között tenyésztünk, és a tenyésztő tápközegből kinyerjük a polipeptidet.

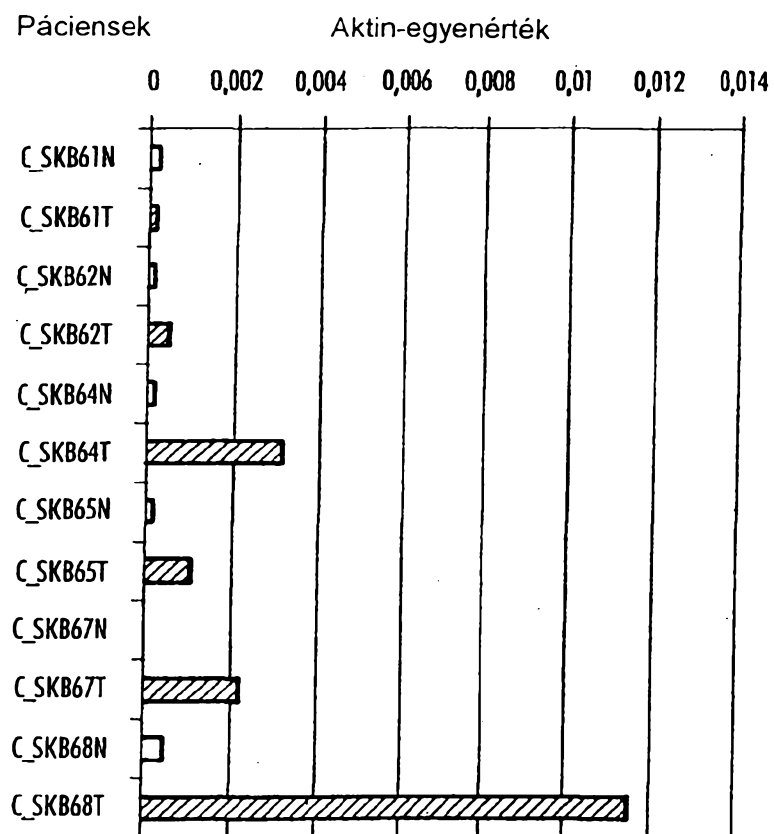
87 oldal
5 oldal
18 oldal

140 oldal

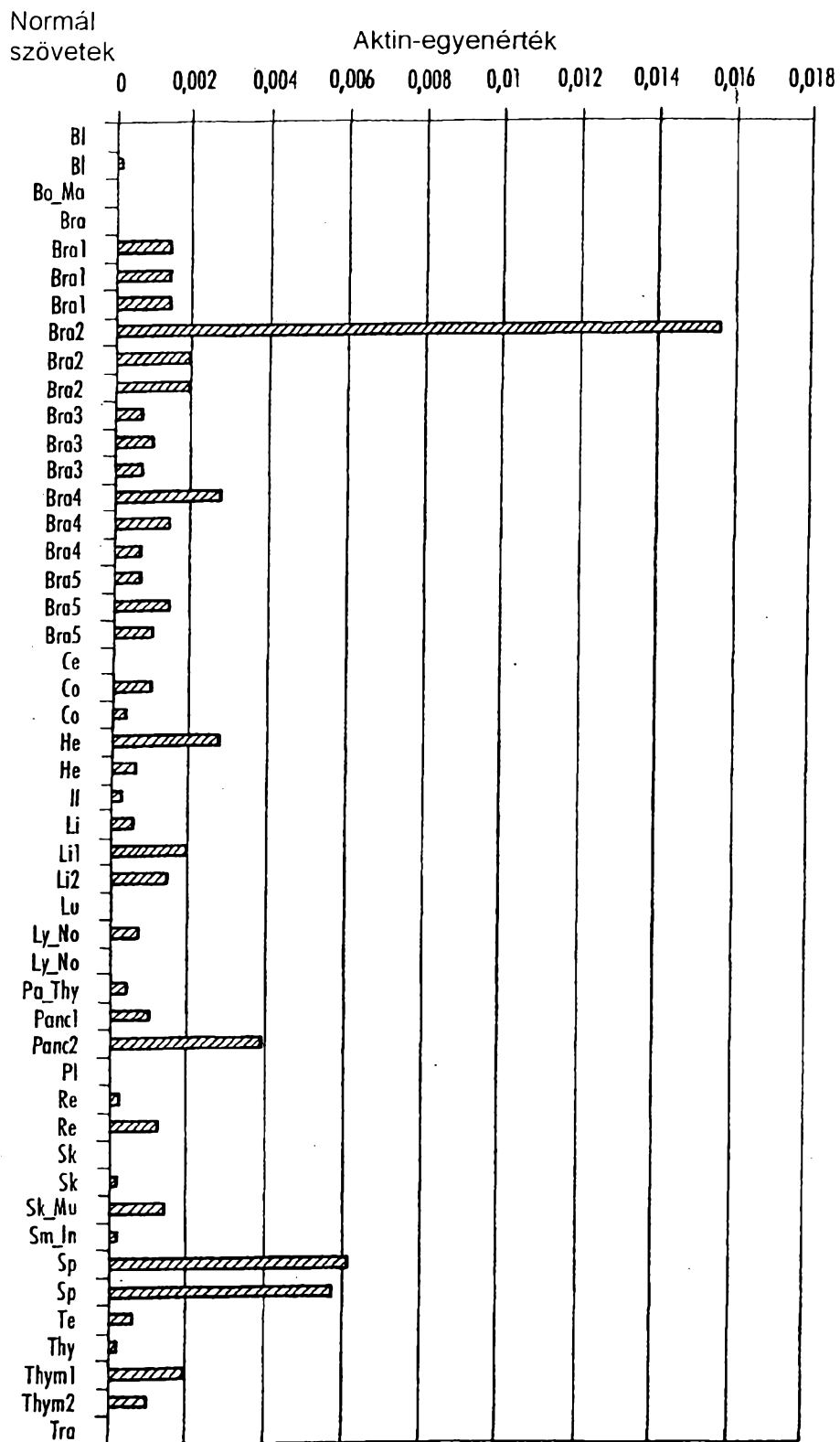
Állam



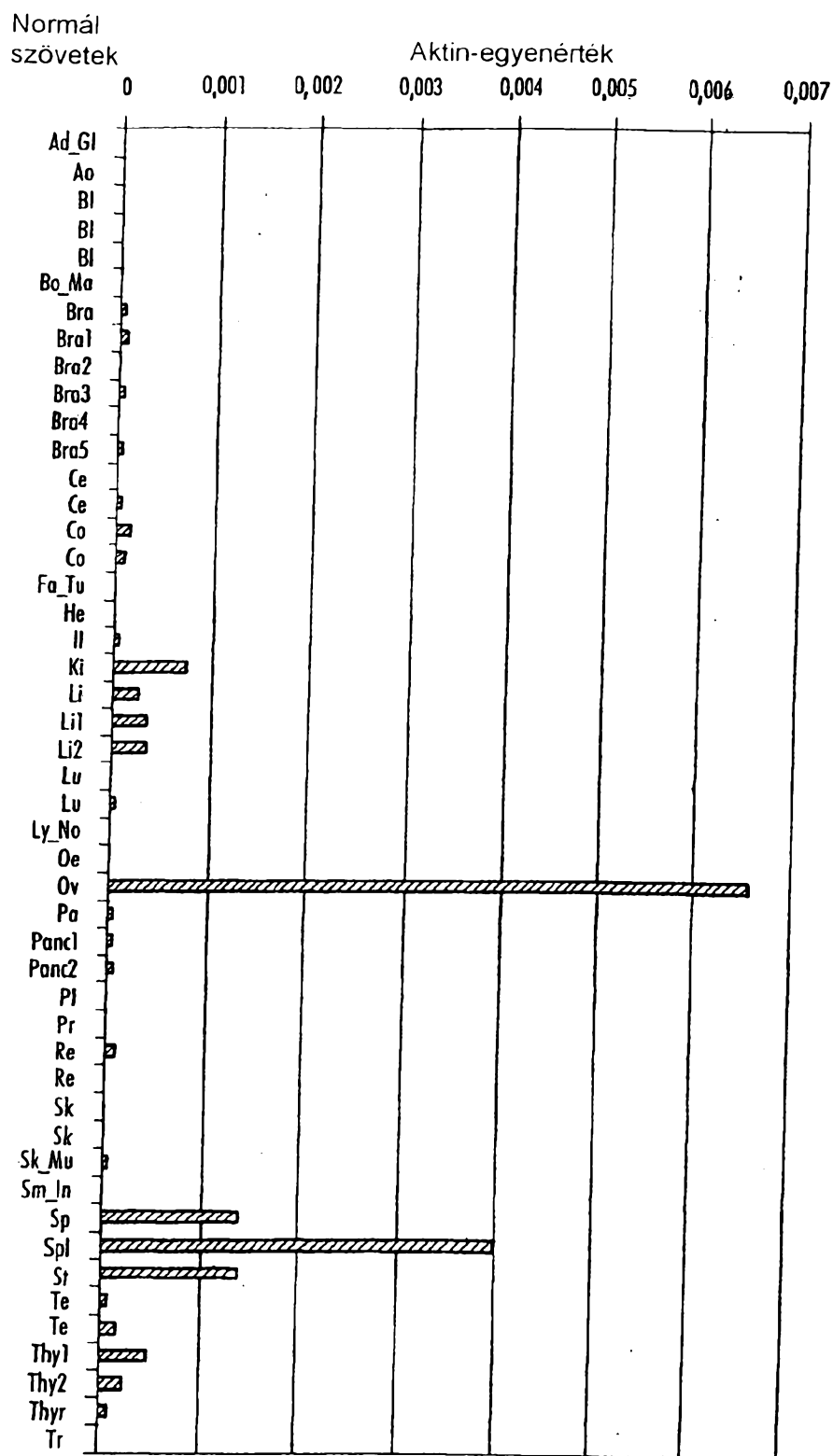
1. ábra



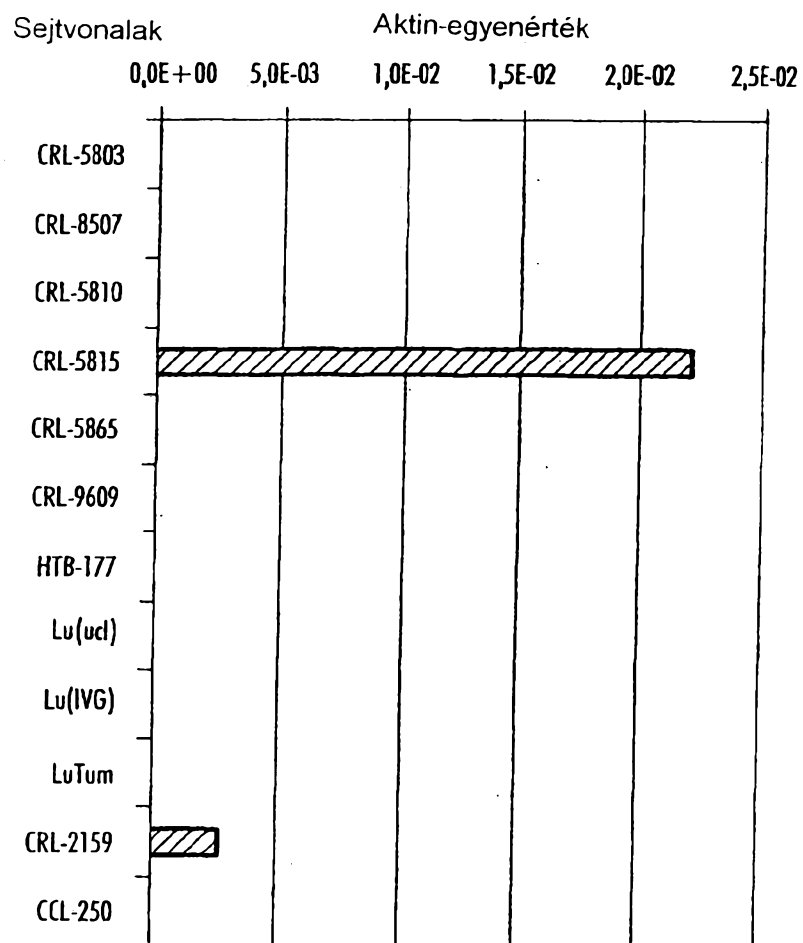
2. ábra



3. ábra



4. ábra



5. ábra