



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

215 245 B

(21) A bejelentés ügyszám: P 92 02073
(22) A bejelentés napja: 1990. 12. 18.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/453,570 1989. 12. 20. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 90/07289
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 91/09059

(51) Int. Cl.⁶

C 07 K 14/54

C 07 K 7/08

C 07 K 14/00

C 12 P 21/08

A 61 K 39/395

(40) A közzététel napja: 1994. 01. 28.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1998. 11. 30.

(72) Feltalálók:

Ramanathan, Lata, West Orange, New Jersey (US)

Seelig, Gail Fouré, Watchung, New Jersey (US)

Trotta, Paul P., Secaucus, New Jersey (US)

(73) Szabadalmas:

Schering Corp., Kenilworth, New Jersey (US)

(74) Képviselő:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi

Iroda, Budapest

(54) **Eljárás a humán interleukin-4 (IL-4) polipeptidek, ezekkel termelt antitestek és az antitesteket tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására**

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás polipeptid előállítására, amely 5–26 aminosav-maradékot tartalmaz, és aminosav-szekvenciája megfelel a humán IL-4 61–82 aminosav-maradékból álló szekvenciájának, vagy ennek egy alszekvenciájának, vagy a humán IL-4 104–129 aminosav-maradékból álló szekvenciájának, amely abban áll, hogy a polipeptidet a megfelelő aminosav-maradékból egy peptidszintézisben ismert eljárással megszín-

tezizálják, és adott esetben kovalens kötással egy hordozómolekulához kapcsolják.

A találmány továbbá ezekkel a polipeptidekkel végzett immunizálással nyert poliklonális, monoklonális antitestek, valamint anti-idiotípus antitestek előállítására is vonatkozik.

A találmány tárgyát képezi továbbá a fenti antitesteket tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítása.

HU 215 245 B

Az interleukin-4 egy olyan protein, amely a hematopoetikus sejtek széles spektrumára hat [Strober et al., *Pediatr. Res.*, 24, 549 (1988)]. Az IL-4 számos aktivitás fokozója. Fokozza a makrofág funkcióit, az IgG- és IgE-termelést, továbbá az immunglobulin-stimulált B-sejtek, antigén-stimulált T-sejtek és az eritropoietin-stimulált vörösvérsejt-progenitor sejtek proliferációját. Növeli az IL-3-stimulált hízósejtek proliferációját is.

Az IgE-vel együtt a hízósejtek is központi szerepet játszanak az allergiás reakciókban. A hízósejtek szemcsés kötőszöveti sejtek, amelyek az egész testet behálózó kapillárisok közelében helyezkednek el, különösen koncentráltan a tüdőben, bőrben és a gyomor-bél és húgyivarszervi traktusban. Antigén természetű anyag hatását követően a hízósejtek degranulálódnak, és kémiai mediátorokat, például hisztamint, szerotonint, heparint, prosztaglandinokat stb. bocsátanak ki, s így allergiás reakciót okoznak.

Míthogy az IL-4 stimuláló hatást gyakorolt az IgE-termelésre és a hízósejtek proliferációjára, egy IL-4 antagonistá hasznos lehetne az allergiák kezelésében azért, hogy csökkenti a hízósejtek növekedését és az IgE-termelést.

Néhány kutató antitesteket használt az IL-4 biológiai aktivitásának a gátlására. Például Finkelman és munkatársai [*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 9675 (1986)] BSF-1 (jelenlegi neve IL-4) elleni monoklonális antitestet használtak az IL-4 indukálta IgE-termelés gátlására egerekben, amelyeket vagy *Nippostrongylus brasiliensis* hematoda parazitával fertőztek, vagy kecskében termelt egér IgD elleni tisztított antitesttel oltottak. Ismeretes, hogy mindkét kezelés stimulálja az IgE-termelést; az utóbbi kezeléstről azt is tudjuk, hogy stimulálja az IL-4 elválasztást.

Legutóbb Chretien és munkatársai [*J. Immunol. Meth.*, 117, 67 (1989)] közzölték, hogy a részlegesen tisztított rekombináns humán IL-4 elleni poliklonális nyúl antiszérum az IL-4 bizonyos biológiai aktivitásait *in vitro* semlegesíti. Az érett humán IL-4 3-18, 31-46, 52-65 és 112-127 csoportjainak megfelelő aminosav-szekvenciával rendelkező szintetikus polipeptidok elleni monoklonális antitestek azonban nem semlegesítik az IL-4 bioaktivitását, jóllehet kötődnek a proteinhez.

A találmány 5-26 aminosavcsoportból álló olyan polipeptidekre vonatkozik, amelyek a humán IL-4 61-82 aminosavcsoportjaiból álló szekvenciával vagy annak egy alszekvenciájával vagy az IL-4 104-129 aminosavcsoportjainak megfelelő szekvenciával rendelkeznek. Az előnyös polipeptidok az alábbi aminosav-szekvenciákkal jellemezhetők:

Lys-Asp-Thr-Arg-Cys (KDTRC, 61-65),
 Thr-Ala-Gln-Gln-Phe-His-Arg-His (69-76),
 Lys-Asp-Thr-Arg-Cys-Leu-Gly-Ala-Thr-Ala-Gln-Gln-Phe-His-Arg-His-Lys-Gln-Leu-Ile-Arg-Phe (61-82), és
 Ala-Asn-Gln-Ser-Thr-Leu-Glu-Asn-Phe-Leu-Glu-Arg-Leu-Lys-Thr-Ile-Met-Arg-Glu-Lys-Tyr-Ser-Lys-Cys-Ser-Ser (104-129).

A fenti, humán IL-4 polipeptideket a találmány értelmében bármely ismert, a peptidszintézisben szokáso-

san alkalmazott eljárással megsztetizálhatjuk. Előnyösen szilárd fázisú peptidszintézist alkalmazunk.

A találmány tárgyát képezi a találmány szerint előállított, fentiekben definiált polipeptidok elleni poliklonális antitestek előállítására szolgáló eljárás, amely abban áll, hogy egy találmány szerint előállított polipeptiddel egy donorállatot immunizálunk, kívánt esetben egy vagy több emlékeztető oltás után az állatból vért veszünk, majd szérumot készítünk, amelyet standard módszerekkel szűrünk, amelyben az említett polipeptidet használjuk antigénként.

A találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerint előállított, fentiekben definiált polipeptidok elleni monoklonális antitestek előállítására szolgáló eljárás, amely abban áll, hogy egy donorállatot egy találmány szerint előállított polipeptiddel immunizálunk, immunkompetens B-sejteket izolálunk az immunizált donorállatból, a B-sejteket mieloma sejtvonalakkal fuzionáltatjuk, és a keletkező hibridómák közül szelektáljuk az említett polipeptid-antigént felismerő antitesteket termelő hibridóma sejteket, az így kapott hibridóma sejteket tenyésztjük, és a termelt monoklonális antitestet a tenyésztettől elválasztjuk.

A találmány tárgyát képezi a fent említett antitestek elleni anti-idiotípus antitestek előállítására szolgáló eljárás is. Ezeket a találmány értelmében úgy állítjuk elő, hogy egy állatot egy találmány szerint előállított poliklonális vagy monoklonális antitesttel immunizálunk, és az immunizált állat véréből az anti-idiotípus antitesteket standard eljárásokkal teljes poliklonális antiszérum formájában vagy ennek egy IgG-frakciója formájában vagy hibridómák által termelt monoklonális antitestek formájában kinyerjük. Ezek az antitestek valószínűleg úgy gátolják az IL-4 biológiai aktivitását, hogy az IL-4-gyel versenyeznek a sejt receptoraihoz való kötődésért.

A találmány továbbá eljárást ismert a humán IL-4 sejtreceptorokhoz való kötődésének gátlására. Az eljárás abban áll, hogy a humán IL-4 receptorokat hordozó sejteket a találmány szerint előállított poliklonális, monoklonális vagy anti-idiotípus antitestekkel hozzuk érintkezésbe.

A találmány szerint előállított antitest-antagonistákat felhasználhatjuk *in vitro* a receptorkötés tanulmányozásában, hogy meghatározzuk az IL-4 hatásmechanizmusát, és/vagy hogy azonosítsuk az IL-4 agonistáit vagy más antagonistáit. Ezek allergiák kezelésére lennének használhatók, mivel csökkentik az IL-4 stimulált hízósejtek proliferációját, és az IgE-termelést.

A találmány ezek alapján az IL-4 közvetítette allergiák vagy más állapotok kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására is vonatkozik, melynek során egy vagy több találmány szerint előállított antitest hatékony mennyiségét fiziológiás szempontból elfogadható hordozóval összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

Az alábbiakban röviden ismertetjük az ábrákat, melyekre való hivatkozás révén a találmány sokkal érthetőbbé válik.

Az 1. ábra az érett humán IL-4 aminosav-szekvenciáját mutatja be, amino-terminális végétől karboxi-terminális végéig.

A 2. ábra grafikusán ábrázolja az IL-4 (alsó görbe) és a 7-es polipeptid (felső görbe; lásd az 1. táblázatot) kötődését egy ezen polipeptid elleni nyúl IgG-frakcióhoz. Az analíziseket direkt ELISA-val végeztük. A megkötött protein/polipeptid mennyiséget pikomólban, a 414 nm-en mért abszorpció függvényében ábrázoljuk.

A 3. ábra grafikusán ábrázolja, hogy hogyan gátolja egy, a 7-es polipeptid elleni nyúl IgG-frakció a ¹²⁵J-IL-4 specifikus kötődését Daudi-sejtekhez. A specifikusan kötött radioaktivitást a növekvő IgG-koncentráció függvényében ábrázoljuk.

A 4. ábra grafikusán ábrázolja, hogy hogyan gátolja az 1448 számú anti-idiotípus antiszérum a ¹²⁵J-IL-4 specifikus kötődését Daudi-sejtekhez. A specifikusan kötött radioaktivitást a csökkenő antiszérum-koncentráció függvényében ábrázoljuk.

Az 5. ábrán a 7-es polipeptid elleni nyúl antiszérummal végzett epitóp analízis eredményeinek grafikus ábrázolása látható. Az ábrán ELISA-abszorpciót ábrázolunk, amelyet az antiszérumnak az analízisben használt oktapeptid-sorozathoz való kötődése eredményez. Az oktapeptidek számozása a 3. táblázatban megadott számoknak felel meg.

A 6. ábrán a 6-os polipeptid elleni nyúl antiszérummal végzett epitóp analízis eredményének grafikus ábrázolása látható. Az ábrán az antiszérumnak az analízisben használt oktapeptid-sorozathoz való kötődés következtében létrejött ELISA-abszorpciót ábrázoljuk. Az antiszérumot, amelyet az A táblán bemutatott eredmények eléréséhez használhatunk, a nyúlimmunizálás elején gyűjtöttük, és ez a szérum nem gátolta a ¹²⁵J-IL-4 kötődését Daudi-sejtekhez. A B táblán használt antiszérumot később gyűjtöttük, és ez a szérum erősen gátolja a jelzett IL-4 kötődését. Az oktapeptidek száma a 4. táblázatban megadott számoknak felel meg.

A leírásban az idézett közlemények teljes egészükben referenciákként szerepelnek. A bemutatott polipeptidek aminosav-szekvenciáit az egy nagybetűs vagy a hárombetűs jelekkel írjuk le (Lehninger, Principles of Biochemistry, 1982, Worth Publishers Inc., New York, 96. oldal).

A találmány olyan antitesteket bocsát rendelkezésre, amelyek azáltal gátolják a humán IL-4 kötődését sejtreceptorokhoz, hogy

- (a) az IL-4 egy olyan szakaszával kötődnek, amely valószínűleg részt vesz a receptorokkal való kölcsönhatásban, és hogy
- (b) magát az IL-4-et mimelik, s így versenyben vannak a sejtreceptorokhoz való kötődésért.

Mint ahogy az IL-4 stimulálja az allergiás válaszok két effektorát, az IgE-antitesttermelést, és a hízósejt-proliferációt, a találmány szerinti antitest-antagonisták felhasználhatók az allergiák kezelésében. Ezeket in vitro IL-4-receptorokotó rendszerekben szintén felhasználhatjuk az IL-4 hatásmechanizmusának a felderítésé-

re vagy további IL-4 antagonisták vagy agonisták szűrésére.

Ebben a leírásban a humán „IL-4” alatt egy olyan proteint értünk, amelynek

- 5 (a) az aminosav-szekvenciája az 1. ábrán látható érett humán IL-4-szekvenciával lényegében azonos, és
- (b) biológiai aktivitása az eredeti IL-4-ével közös.

Az aminosav-szekvencia lényegi azonossága azt jelenti, hogy egy másik IL-4-szekvencia az 1. ábra szerinti szekvenciával összehasonlítva vagy azonos vele, vagy egy vagy több megváltozása miatt (deléciók, addíciók, szubsztitúciók), amelyek lényegében nem veszélyeztetik a biológiai aktivitást, különbözik tőle.

Természetesen a fent említett IL-4-szakaszokban lévő aminosav-szekvenciák különbözhetnek a lényegében azonos IL-4-ekben lévőktől.

Szintetikus polipeptidekkel végzett vizsgálatok – lásd alább – kimutatták, hogy a humán IL-4-molekulán belül két olyan szakasz van, amelyek – úgy tűnik – szerepet játszanak a receptorkötésben. Alkalmos hivatkozási szempontból ebben a leírásban e polipeptidek aminosav-szekvenciáit az 1. ábrán bemutatott érett humán IL-4 aminosav-szekvenciáiban lévő csoportok pozíciójával határozzuk meg: az 1-es az aminoterminális hisztidincsoport és a 129-es a karboxiterminális szerincsoport.

Vizsgálataink eredményeként megállapítottuk, hogy azok a szintetikus polipeptidek, amelyeknek az aminosav-szekvenciája a humán IL-4, vagy alszekvenciáinak 52–82 és 104–129 csoportjaiból álló szekvenciának felelnek meg, antigénként használhatók arra, hogy állatokban olyan antitestek termelését indítsuk meg, amelyek kötődnek a polipeptidekhez és a humán IL-4-hez. A találmány szerinti antitestek, minthogy az IL-4 ezen specifikus szakaszaihoz képesek kötődni, legalább 60%-ban gátolják a ¹²⁵J-IL-4 specifikus kötődését IL-4 receptorokat hordozó sejtekhez.

Az IL-4 előbb említett kötőszakaszai közül a leghosszabb (52–82 csoportok) körülbelül 30 aminosav-csoportot tartalmaz. A szakmában jól ismert, hogy az antigéndeterminánsok (epitópok) általában legalább 5 aminosav-csoportot tartalmaznak [Ohno et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 2945 (1985)]. Tehát a találmány szerinti polipeptidek körülbelül 5–30 aminosav-csoportból állnak, és a fent említett aminosav-szekvenciával rendelkeznek. Azt, hogy egy adott polipeptid a találmány oltalmi köréhez tartozik-e, könnyen meghatározhatjuk rutinkísérletekkel az alábbiakban leírt módszerek alkalmazásával.

A polipeptideket egy alkalmas eljárással szintetizáljuk, ilyen a teljesen szilárd fázisú szintézis, a részleges szilárd fázisú módszerek, a fragmentumkondenzálás vagy a klasszikus folyadékfázisú szintézis. A polipeptideket előnyösen szilárd fázisú peptidszintézissel állítjuk elő, Merrifield [J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963)] szerint. A szintézist alfa-amino-terminális végükön védett aminosavakkal végezzük. A labilis oldalláncú trifunkciós aminosavakat megfelelő csoportokkal védjük, hogy megelőzzük a nem kívánt kémiai reakciók előfordulását a polipeptid összeállítása folya-

mán. Az alfa-amino-védőcsoportok eltávolításához alkalmas körülmények között nem távolítják el az oldallánc-védőcsoportokat.

Ismertek azok az alfa-amino-védőcsoportok, amelyeket a lépcsőzetes polipeptidszintetizáló technikában használnak. Ilyenek az acil típusú védőcsoportok (például formil-, trifluor-acetil-, acetilcsoportok), az aromás uretán típusú védőcsoportok [például: benzil-oxi-karbonil- (Cbz), szubsztituált benzil-oxi-karbonil- és 9-fluorenil-metoxi-karbonil- (Fmoc) csoportok], alifás uretán típusú védőcsoportok [például: t-butil-oxi-karbonil- (Boc) csoport] és az alkil típusú védőcsoportok (például: benzil-, trifenil-metil-csoport). Előnyös védőcsoport a Boc. A Tyr számára alkalmas védőcsoportok közé tartoznak például a következők: tetrahidropiranyl-, tercier-butil-, tritol-, benzil-, Cbz-, 4-Br-Cbz- és 2,6-diklór-benzil-csoport. Előnyös oldallánc-védőcsoport Tyr számára a 2,6-diklór-benzil-csoport. Asp-hoz alkalmas oldallánc-védőcsoportok például a következők: benzil-, 2,6-diklór-benzil-, metil-, etil- és ciklo-hexil-csoport. A Thr- és Ser-csoportokhoz alkalmas oldallánc-védőcsoportok például a következők: acetil-, benzoil-, tritol-, tetrahidropiranyl-, benzil-, 2,6-diklór-benzil- és Cbz-csoport. Előnyös védőcsoport Thr és Ser számára a benzilcsoport. Az Arg-hoz alkalmas oldallánc-védőcsoportok közé tartoznak a nitro-, Tos-, Cbz-, adamantil-oxi-karbonil- és Boc-csoportok. Az előnyös védőcsoport Arg számára a Tos-csoport. Az oldallánc Lys-aminocsoportját a következő csoportokkal védhetjük meg: Cbz-, 2-Cl-Cbz-, Tos- vagy Boc-csoport. Lys számára a 2-Cl-Cbz-csoport előnyös.

A kiválasztott oldallánc-védőcsoportoknak épeknek kell maradniuk az összekapcsolás folyamán, és nem szabad eltávolítani ezeket az aminoterminális védőcsoportok védőhatásának megszüntetése alatt vagy az összekapcsolás körülményei között. Az oldallánc-védőcsoportokat a szintézis befejezése után olyan reakciókkal kell eltávolítani, amelyek nem változtatják meg a kész polipeptidet.

A szilárd fázisú szintézist általában a karboxi-terminális végnél kezdjük meg úgy, hogy a védett alfa-amino-csoportot (védett oldallánc) rákapcsoljuk az alkalmas szilárd hordozóra. Észterkötés keletkezik, ha a kapcsolást klór-metil- vagy hidroxil-metil-gyanta használatával végezzük, s így a kapott polipeptid szabad karboxilcsoporttal fog rendelkezni C-terminális végénél. Ha benzhidril-amin vagy p-metil-benzhidril-amin-gyantát használunk, amidkötés keletkezik, és a kapott polipeptidnek karboxamid-csoportja lesz C-terminális végénél. Ezek a gyanták a kereskedelemből beszerezhetők, készítésüket Stewart és munkatársai írták le [„Solid Phase Peptid Synthesis” (2. kiadás), Pierce Chemical Co., Rockford, IL., USA (1984)].

A C-terminális aminosavat – ha szükséges, védjük az oldalláncon és az alfa-amino-csoporton – benzhidril-amin-gyantához kapcsoljuk különböző aktiválóanyagok használatával, ilyen például a diciklohexil-karbodiimid (DCC), az N,N'-diizopropil-karbodiimid és a karbonil-diimidazol. A gyantahordozóval való összekapcsolás után az alfa-amino-védőcsoportot

trifluor-ecetsav (TFA) vagy sósavas dioxán használatával távolítjuk el 0 °C és 25 °C között. Metionin (Met) bevitele után a TFA-hoz dimetil-szulfidot adunk a lehetséges S-alkileződés megakadályozására. Az alfa-amino-védőcsoport eltávolítása után a visszamaradt aminosavakat lépésenként, a kívánt sorrendben kapcsoljuk össze, hogy megkapjuk a kívánt szekvenciát.

Az összekapcsolási reakciókban különböző aktiválóreagenseket használhatunk, ilyen például a DCC, N,N'-diizopropil-karbodiimid, benzo-triazol-1-il-oxi-trisz-(dimetil-amino)-foszfónium-hexafluoro-foszfát (BOP) és a DCC/hidroxi-benzo-triazol (HOBt). Minden védett aminosavat feleslegben (>2,0 ekvivalens) használunk, és az összekapcsolást rendszerint N-metil-pirrolidinben (NMP) vagy DMF-ben (N,N-dimetil-formamid) vagy metilén-dikloridban (CH₂Cl₂) vagy ezek elegyében végezzük. Minden lépésben ellenőrizük, például ninhidrin-reakcióval [Kaiser et al., *Anal. Biochem.*, 34, 595 (1970)], hogy az összekapcsolási reakció milyen mértékben ment végbe. Azokban az esetekben, amikor azt találjuk, hogy az összekapcsolódás nem teljes, az összekapcsolási reakciót megismételjük. Az összekapcsolási reakciót automatikusan, kereskedelembe forgalmazott készülékkel is elvégezhetjük.

A kívánt polipeptid teljes összeállítása után a polipeptid-gyanta kötést 0 °C-on, 1–2 óra alatt elhasítjuk. Ilyen célra alkalmas reagens például a hidrogén-fluorid, amely a polipeptidet lehasítja a gyantáról, és eltávolítja az összes oldallánc-védőcsoportot. A folyékony hidrogén-fluoridhoz rendszerint anizolt használunk gyökfógóként, hogy a hasítás folyamán keletkezett kationokat megakadályozzuk abban, hogy a polipeptidben lévő aminosavcsoportokat alkilezzék. A gyanta-polipeptid védelmét kívánt esetben a hasítás előtt TFA/ditio-etánnal szüntethetjük meg.

Szilárd hordozón az oldallánc oldallánccal képzett gyűrűjének kialakítása olyan ortogonális védőrendszer használatát kívánja meg, amely lehetővé teszi a savanyú aminosavak (például Asp) és a bázikus aminosavak (például Lys) oldalláncfunkcióinak szelektív hasítását. Erre a célra a 9-fluorenil-metil- (Fm) védőcsoportot használjuk az Asp oldalláncához és a (9-fluorenil-metoxi)-karbonil- (Fmoc) védőcsoportot használjuk a Lys oldalláncához. Ezekben az esetekben a Boc-védett polipeptid-gyanta oldallánc-védőcsoportjait DMF-ben oldott piperidinnel szelektíven távolítjuk el. Szilárd hordozón a gyűrűzárást különböző aktiválóanyagok használatával érjük el, ilyenek például a DCC, DCC/HOBt vagy BOP. A hidrogén-fluoridos reakciót a gyűrűs peptidgyanta esetében a fent leírt módon végezzük el.

Rekombináns DNS-metodológia is használható a polipeptidek elkészítéséhez. A kívánt aminosav-szekvenciákat kódoló oligonukleotidok szintetizálására felhasználható az ismert genetikai kód, amelyet kívánt esetben átalakíthatunk ismert előnyös kodonokkal, hogy egy adott gazdaszervezetben hatékonyabb expressziót érjünk el. A Matteucci és munkatársai [J. Am. Chem. Soc., 103, 3185 (1981)] szerinti foszforamidites szilárd fázisú módszert vagy más ismert módszereket használhatunk ezekhez a szintézisekhez. A kapott

oligonukleotidokat megfelelő vektorba építhetjük be, és egy kompatibilis gazdaszervezetben fejzhetjük ki.

A találmány szerinti polipeptideket HPLC-vel, gélszűrővel, ioncserélő és megoszlásos kromatográfiával, ellenáramú elválasztással és más jól ismert módszerekkel tisztíthatjuk.

A találmány szerinti polipeptidek ellen standard módszerek használatával antitesteket termelhetünk. A leírásban használt „antitest” szó mind poliklonális, mind monoklonális antitestekre vonatkozik, továbbá teljes immunglobulinokra is és ezek antigénkötő fragmentumaira is.

A poliklonális antitesteket úgy termeljük, hogy az egyik polipeptiddel állatot immunizálunk, például nyulat, patkányt, kecskét, birkát, egeret stb. Előnyös, ha az első injekció után egy vagy több emlékeztető oltást adunk az antitestszint növelése céljából. Ezután vért veszünk az állatból, majd szérumot készítünk, amelyet standard módszerekkel szűrünk, például enzim-immuno-assayvel (ELISA), amelyben a polipeptidet használjuk antigénként.

A polipeptidek immunogenitását előnyösen úgy növeljük, hogy adjuvánssal kombináljuk és/vagy az immunizálás előtt formáját megnöveljük.

Az állatok vakcinálására használt alkalmas adjuvánssok közé tartozik például az Adjuvant 65 [amerikai mogyoróolajat, mannidmono-oleátot (Arlacel A) és alumínium-mono-sztearátot tartalmaz]; a Freund komplett vagy inkomplett adjuváns; a szervesetlen gélek, például az alumínium-hidroxid, alumínium-foszfát és timsó; a felületaktív anyagok, így a hexadecil-amin, oktadecil-amin, lizolecitin, dimetil-dioktadecil-ammónium-bromid, N,N-dioktadecil-N,N'-bis(2-hidroxi-metil)-propán-diamin, metoxi-hexadecil-glicerol és a Pluronic poliolkok; a polianionok, mint a pirán, dextrán-szulfát, poli-IC, poli-akrilsav és karbopol; a peptidok, mint a muramil-dipeptid, dimetil-glicin és tuftszin; és az olajemulziók. A polipeptideket liposzómákba vagy más mikrokarrierbe való bevitelük után is beadhatjuk. A fenti felsorolás nem korlátozó jellegű.

A polipeptidek immunogenitását úgy is fokozhatjuk, ha a polipeptidet térhálósítjuk vagy hordozómolekulához kapcsoljuk (a makromolekuláknak az a tulajdonsága, hogy az állatban immunológiai választ vált ki önmaga is, és ilyen makromolekulához köthetjük a találmány szerinti polipeptideket kovalens kötéssel). A térhálósítás vagy a hordozómolekulával való konjugálás szükséges lehet, mivel a kis polipeptidek néha mint haptének viselkednek (a haptének olyan molekulák, amelyek képesek specifikusan kötődni egy antitesthez, de nem képesek antitesttermelést kiváltani, tehát nem immunogének). Az ilyen peptidoknak egy immunogén hordozómolekulával való konjugálása a fragmentumokat immunogénné változtatja, mely általában „carrier effect” néven ismert.

Alkalmas hordozómolekulák például a proteinek és a természetes vagy szintetikus polimervegyületek. Ilyenek a polipeptidek, poliszacharidok, lipopoliszacharidok stb. Hasznos hordozó a Quil A elnevezésű glükozid, melyet Morein és munkatársai írtak le [Nature,

308, 467 (1984)]. Különösen a proteinhordozó molekulákat részesítjük előnyben, ezek közé tartoznak a tengeri csiga hemocianin (keyhole limpet hemocyanin) és az emlős-szérumproteinek, mint a humán vagy bovin gammaglobulin, a humán vagy bovin vagy nyúl-szérum-albumin vagy e proteinek metilezett formái vagy más származékai. Ez a felsorolás nem jelent korlátozást, természetesen más proteinhordozókat is ismernek a szakemberek. Előnyös, de nem szükséges, hogy a proteinhordozó idegen legyen annak az állatnak a számára, amelyben a polipeptidek ellen antitesttermelést óhajtunk kiváltani.

A hordozómolekulához való kovalens kötés kialakítását a szakterületen jól ismert módszerek használatával végezhetjük, s ezeknek a megválasztását a használt hordozómolekula tulajdonsága határozza meg. Ha az immunogén hordozómolekula protein, a találmány szerinti polipeptideket például vízben oldható karbodiimidek – például diciklohexil-karbodiimid vagy glutáraldehid – segítségével köthetjük rá.

A kötést elősegítő ilyen reagensek felhasználhatók maguknak a polipeptideknek a hálósítására is, külön hordozómolekula használata nélkül. A hálósítás révén keletkező aggregátumok szintén növelni képesek az immunogenitást.

Az így immunizált állatokban termelt szérum közvetlenül is felhasználható. Egy másik módszer szerint az IgG-frakciót standard eljárásokkal választjuk el a szérumból, például plazmaforézissel vagy adszorpciós kromatográfiával, amikor is IgG-specifikus abszorbeneket, például immobilizált A-t használunk.

A monoklonális antitesteket standard módszerekkel állíthatjuk elő, például Köhler és munkatársai szerint [Nature, 256, 495 (1975); Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)]. Lényegében állatot immunizálunk a fent leírtak szerint, s így antitest-szekretáló szomatikus sejtek keletkeznek. Ezeket a sejteket eltávolítjuk az immunizált állatból, s mielomasejtekkel fuzionáljuk.

A potenciálisan antitesttermelő szomatikus sejtek, főképpen a B-sejtek, alkalmasak mieloma-sejtvonalakkal való fúzióra. A szomatikus sejtek az oltott állat nyirokmirigyéből, lépéből és perifériás véréből származhatnak. A találmány megvalósítását bemutató egy példában részben egérlépsejteket használtunk, mivel ezek a sejtek viszonylag nagy százalékban képesek stabilan fuzionálni egérmeloma-sejtvonalakkal. Egyébként patkány-, nyúl-, béka- vagy más sejteket is használhatunk.

A hibridomatermelő fúziós eljárásokhoz szükséges specializált mieloma-sejtvonalakat limfociták tumorokból fejlesztették ki [Köhler és Milstein, Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976); Shulman et al., Nature, 276, 269 (1978); Volk et al., J. Virol., 42, 220 (1982)]. E sejtvonalak kifejllesztésének legalább három oka volt. Az első: a fuzionált hibridomáknak a nem fuzionált és a hasonlóan végtelenségig szaporodó mielomasejtektől való elválasztásának a megkönnyítése. Ezt rendszerint úgy oldják meg, hogy enzimhiányos mielomasejteket használnak, amelyek nem képesek bizonyos olyan szelektív táptalajban növekedni, amely a hibridomák nö-

vekedését fenntartja. A második ok a limfocitás tumor-sejteknek arra a tulajdonságára vezethető vissza, hogy saját antitesteket termelnek. A monoklonális technika használatának az a célja, hogy olyan fuzionált hibrid sejtvonalakhoz jussunk, amelyeknek korlátlan az élet-tartama, és a kívánt egyetlen antitestet termelik a hibridóma szomatikus sejt komponensének genetikai kontrollja alatt. A hibridómák tumorsejtantitest-termelésének kiküszöbölése érdekében olyan mieloma-sejtvonalakat használnak, amelyek nem képesek immunoglobulin könnyű vagy nehéz láncok termelésére, vagy nincs antitest-szekrécións mechanizmusuk. A harmadik oka a sejtvonalak kiválasztásának, hogy alkalmasak legyenek a fúzióra, és jó hatásfokkal fuzionáljanak.

Fuzionált sejthibridek előállítására számos mielomasejtvonalat használhatunk. Például: P3X63–Ag8, P3/NS1–Ag4–1 (NS–1), Sp2/O–Ag14 és S194/5.XXO.Bu.1. A P3X63–Ag8 és az NS–1 sejtvonalat Köhler és Milstein írta le [Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)]. Shulman és munkatársai [Nature, 276, 269 (1978)] fejlesztették ki az Sp2/O–Ag14 mielomasejtvonalat. Az S194/5.XXO.Bu.1 sejtvonalat Trowbridge [J. Exp. Med., 148, 313 (1979)] ismertette.

Az antitesttermelő lép- vagy nyirokmirigysejtek és a mielomasejtek hibridjeinek az előállítására használt eljárásokban a szomatikus sejteket és a mielomasejteket rendszerint 10:1 arányban keverik (az arány 20:1-től 1:1-ig változhat) olyan hatóanyag vagy hatóanyagok (kémiai, virális vagy elektromos) jelenlétében, amelyek a sejtmembránok fúzióját elősegítik. A fúziós eljárásokat Köhler és Milstein (lásd fentebb), Gefer és munkatársai [Somatic Cell Genet., 3, 231 (1977)] és Volk és munkatársai [J. Virol., 42, 220 (1982)] írták le. Az említett szerzők fúziót segítő hatóanyag gyanánt a Sendai vírust és a polietilén-glikolt (PEG) használták. A találmány szerinti példában leírt fúziós eljárásban PEG-et használtunk.

Míthogy a fúziós eljárásokban igen kis gyakorisággal keletkeznek élő hibridek (például ha lépsejteket használunk szomatikus sejtekként, minden 1×10^5 lépsejtből körülbelül csak egy hibridet kapunk), lényeges, hogy eszközeink legyenek a fuzionált sejthibrideknek a megmaradt nem fuzionált sejtektől, különösen a nem fuzionált mielomasejtektől való elválasztására. Szükség van arra is, hogy ki tudjuk mutatni a kívánt antitesttermelő hibridómákat a többi fuzionált sejthibrid közül.

A fuzionált sejthibrideket általában úgy szelektáljuk, hogy a sejteket olyan táptalajban tenyésztjük, amely a hibridómasejtek növekedését fenntartja, de megakadályozza a nem fuzionált mielomasejtek növekedését, mivel osztódásuk normál körülmények között végtelenségig folytatódna. A fúzióhoz használt szomatikus sejtek életképessége in vitro tenyészetben nem tart hosszú ideig, és így ez nem jelent problémát. A találmányban szereplő példában olyan mielomasejteket használunk, amelyek nem termelnek hipoxantinfoszforibozil-transzferázt (HPRT-negatív sejtek). Ezekkel a sejtekkal szemben hipoxantin/aminopterin/timidin (HAT) táptalajban történik a szelektálás. Ebben a tápta-

lajban a fuzionált sejthibridek túlélők lesznek a lépsejtek HPRT-pozitív genotípusának köszönhetően. Különböző genetikai hiányossággal rendelkező (gyógyszerérzékenységek stb.) mielomasejteket is használhatunk, ezeket a genotípusosan kompetens hibridek növekedését fenntartó táptalajjal szemben szelektáljuk.

A fuzionált sejthibridek szelektív tenyésztése többet vesz igénybe. Ez idő alatt legelőször azokat a hibrideket szükséges azonosítani, amelyek a kívánt antitestet termelik, hogy ezután ezeket klónozzuk és szaporítsuk. A kapott hibrideknek általában körülbelül a 10%-a termeli az antitestet, de nem ritka a körülbelül 1%-tól körülbelül 30%-ig terjedő tartomány. Az antitesttermelő hibridek kimutatását a számos standard vizsgáló módszer bármelyikével elvégezhetjük, többek között enzim-immuno-assay-vel és radio-immuno-assay-vel. Ezeknek a technikáknak a leírása a szakirodalomban megtalálható [lásd például: Kennet et al. (szerkesztők), Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, 376–384. oldalak, Plenum Press, New York (1980)].

Mihelyt a kívánt fuzionált sejthibrideket szelektáltuk, és beklónoztuk egyedi antitestet termelő sejtvonalakba, a sejtvonalakat két standard eljárás valamelyikével szaporíthatjuk. A hibridómasejt szuszpenzióval hisztokompatibilis állatokat olthatunk. A beoltott állatban ezután tumorok képződnek, s ezek a fuzionált sejthibrid által termelt specifikus monoklonális antitestet szekretálják. Az állat testfolyadékainak – ilyen a szérum vagy az ascites-folyadék – a pungálásával magas koncentrációban kaphatjuk meg a monoklonális antitesteket. Egy másik módszer szerint az individuális sejtvonalakat in vitro, laboratóriumi tenyésztőedényekben szaporíthatjuk. Az egyetlen specifikus monoklonális antitestet magas koncentrációban tartalmazó táptalajt dekantálással, szűréssel vagy centrifugálással arathatjuk le.

Hogy vajon a fent leírt módon előállított antipolipeptid antitestek alkalmasak-e a találmány szerinti felhasználásra, azt egy két részből álló szűrővizsgálattal határozzuk meg:

- (a) ELISA-analízis, amelyben az immunizáló polipeptidet és a humán IL–4-et használjuk antigén gyanánt, és
- (b) radioligand receptorkötő analízis, melyben a ^{125}J –IL–4 sejtreceptorokhoz való specifikus kötődésének gátlását mérjük.

A fenti vizsgálatokban használt rekombináns humán IL–4 kereskedelmi árucikk, beszerezhető például a Genzyme Corporationtól (Boston, MA, USA) egyébként előállíthatjuk az IL–4 gén ismert nukleotidszekvenciájának a felhasználásával [lásd például: WO 87/02990 számon közzétett nemzetközi szabadalmi leírás; Kimmenade et al., Eur. J. Biochem., 173, 109 (1988)].

Az ELISA-analízist standard eljárások szerint végezzük el, ilyen például a Chretien és munkatársai [J. Immunol. Meth., 117, 67 (1989)] szerinti módszer, amelyben egy polipeptidet vagy IL–4-et adszorbeálunk mikrotitráló lemezre. Az immobilizált polipeptidhez

vagy proteinhez kötött antitestek jelenlétét jelzett anti-IgG-vel, mint második antitesttel mutatjuk ki. A második antitesteket előnyösen enzimmel jelezzük, például peroxidázzal, glükóz-oxidázzal, β -galaktozidázzal vagy alkalikus foszfatázzal. A torna peroxidáz spektrofotometriásan mutatható ki, amikor is valamely szubsztátumra – ilyenek a pirogallol, o-fenilén-diamin vagy a 2,2'-azino-bisz(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav) – gyakorolt hatását mutatjuk ki.

Azokat az antitesteket, amelyekről megállapíthatjuk, hogy mind az immunizáló polipeptidhez, mind az IL-4-hez specifikusan kötődnek, tovább vizsgáljuk arra vonatkozóan, hogy képesek-e gátolni a jelzett IL-4 kötődését a megfelelő célsejteken lévő receptorokhoz. A találmány szerinti anti-polipeptid antitestekre jellemző, hogy legalább 60%-ban képesek gátolni ezt a kötődést.

Bármely IL-4 receptorhordozó sejt – ilyenek a Jijoye, U-937, CCRF-CEM és a CEM-CM3 sejtek – felhasználható a kötési vizsgálat elvégzéséhez, de a Daudi-sejtek használata kényelmes, és könnyen beszerezhető. A Daudi-sejtek Burkitt-lymphomás betegből származó jól jellemzett B limfoblaszt sejtvonalat alkotnak, mely az American Type Culture Collection intézménytől ATCC CCL 213 letéti számon beszerezhető. A vizsgálathoz használt ^{125}J -dal jelezzük, s vagy a laktoperoxidáz módszert [David et al., *Biochemistry*, 13, 1014 (1974)] vagy a Bolton és munkatársai által leírt [Biochem. J., 133, 529 (1973)] módszert használjuk. A glükozilált rekombináns humán IL-4 kereskedelmi árucikk, beszerezhető például a Genzyme Corporationtól (Boston, MA, USA).

A találmány szerinti anti-idiotípus ellenanyagok a találmány szerinti polipeptidekben jelenlévő IL-4 antigén determinánsokra specifikus antitestek ellen irányulnak. Az ilyen anti-idiotípus antitestek az eredeti antigén determinánsokat mímelik, vagy ezekhez hasonlóan működnek (lásd például: 4,731,237 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Reagan et al.). Feltehetően ezek az antitestek, hasonlóan magához az IL-4-hez, specifikusan és közvetlenül kötődnek IL-4 receptorokhoz. Az anti-idiotípus antitestek azonban nem rendelkeznek az IL-4 biológiai aktivitásával.

Ezeket az anti-idiotípus antitesteket úgy állítjuk elő, hogy egy találmány szerinti polipeptid elleni (poliklonális vagy monoklonális) antitesttel vakcinálunk egy állatot. Az antitesteket vagy teljes poliklonális antiszérum formájában kaphatjuk meg, vagy ennek IgG-frakciója formájában, vagy klónozott hibridómák által termelt monoklonális antitestek formájában, ahogyan fent leírtuk.

Előállíthatunk olyan gyógyszerkészítményeket, amelyek a találmány szerinti egy vagy több antitest hatékony mennyiségét tartalmazzák egy fiziológiásan elfogadható hordozóval együtt. Az ilyen hordozókat jól ismerik az ezen a területen gyakorlott szakemberek. Az antitesteket közvetlenül vagy készítmény formájában adhatjuk be a betegeknek allergiák vagy más, IL-4 közvetítette állapotok kezelése céljából. A gyógyszerkészítményt úgy állítjuk elő, hogy egy fiziológiailag elfo-

gadható hordozóhoz hozzákeverjük az egy vagy több antitestből álló hatóanyag hatékony mennyiségét.

Egy adott helyzetben a találmány szerinti valamely antitest megfelelő adagolásának a meghatározása a szakmai jártassággal jár együtt. A kezelést általában kisebb adagokkal, az optimálisnál kevesebbel kezdjük. Ezután kicsinyenként növeljük az adatokat, amíg a körülményeknek megfelelő optimális hatást el nem érjük. Kényelmi szempontból a teljes napi adagot szétoszt-hatjuk, és részletekben adhatjuk be a nap folyamán, ha kívánatos.

A találmány szerinti antitestek beadott mennyiségét és az alkalmazás módját a kezelőorvos saját megítélése szerint fogja beállítani, tekintetbe véve bizonyos tényezőket, így a beteg korát, állapotát, testméreteit, valamint a kezelendő kórtünetek súlyosságát.

Az alábbi példák semmiképpen sem korlátozzák a találmány oltalmi körét.

Ha másként nem jelezzük, a szilárd keverékekben a szilárd anyagok, a folyadékokban a folyadékok és a folyadékokban a szilárd anyagok százalékát tömeg/tömeg, térfogat/térfogat, illetve tömeg/térfogat alapján fejezzük ki.

A protein-meghatározásokat Lowry és munkatársai [J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)] módszerével végezzük, standardként bovinszérum-albumint alkalmazva. Az IL-4 bioassay-t Mossman [J. Immunol. Methods., 65, 55 (1983)] által leírt módszerrel végezzük, amikor is a sejtproliferáció stimulációját a PHA-stimulált perifériás vér-limfociták MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid] felvételével mérjük. Egységnyi IL-4-aktivitás az IL-4 azon mennyiségével egyenlő, amely a vizsgálatban 2×10^5 sejtben a maximális stimuláció felét idézi elő. A vizsgálatban a tiszta humán IL-4 egy mikrogrammja körülbelül 20 000 egység aktivitást tartalmaz.

Polipeptid szintézis

Több polipeptidet szintetizáltunk, s ezek aminosav-szekvenciáit összekapcsolva a teljes érett humán IL-4 protein aminosav-szekvenciáját kapjuk meg.

A polipeptideket a Merrifield- [J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963)] féle szilárd fázisú módszerrel szintetizáltuk, az Applied Biosystems Model 430A szintetizátorának alkalmazásával. A terc-butoxi-karbonil-aminóvédőcsoportot használtuk, valamint szimmetrikus anhidrideket. A védőcsoportok eltávolítása után a polipeptideket hidrogén-fluoriddal hasítottuk le a gyantáról.

A polipeptidek tisztítását reverzfázisú HPLC-vel végeztük, Rainin Dyanamax C-8 oszlop alkalmazásával. A kifejlesztés 0,1% trifluor-ecetsavat tartalmazó acetonitril-grádienssel történt. Az eluátum folyamatos ellenőrzését a 214 nm-en mért ultraibolya abszorpcióval végeztük. A tisztított polipeptidek azonosságát aminosav-szekvenálással és tömegspektrál-analízissel végeztük, standard módszerek felhasználásával.

Az előállított polipeptideket, a polipeptidek aminosav-szekvenciáját és az érett humán IL-4 azon csoportjait (szignálpeptid nélkül; lásd az 1. ábrát), amelyeknek a polipeptid-szekvenciáknak megfelelnek, az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat

A polipeptid		A megfelelő IL-4-csoportok
száma	szekvenciája	
1	HKCDITLQEIHKTLNSLTEQKTLCTE	1-26
2	CDITLQEIHKTLNSLT	3-18
3	TEQKTLCTELTVTD	18-31
4	DIFAASKNTEKETFC	31-46
5	ETFSRAATVLRQFYS*	43-57
6	LRQFYSHHEKDTRC	52-65
7	KDTRCLGATAQQFHRHKQLIRF	61-82
8	LKRLDRNLWGLAGLNSCPVK	83-102
9	AQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWG	70-92
10	CPVKEANQSTLEN	99-111
11	ANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS	104-129
12	FLERLKTIMREKYSKC	112-127

* Az 5. számú polipeptid aminosav-szekvenciája a humán IL-443-57 csoportjának felel meg, kivéve, hogy a humán IL-446. pozíciójában lévő ciszteinsoportot szerincsoporttal helyettesítettük.

A humán IL-4 hidrofilitási analízise, amelyet Hopp és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 3824 (1981)] szerint végeztünk, azt mutatta, hogy a 7. polipeptidnek megfelelő szakasz hidrofíl és hibrofób csoportokat egyaránt tartalmaz, s ez előrelátható volt az IL-4-ben lévő alfa-helikális szakasz valószínű formájának másodlagos szerkezete alapján.

Az anti-polipeptid antitestek előállítás és vizsgálata

A humán IL-461-82 csoportjainak megfelelő 7-es számú polipeptid (1. táblázat) 2 mg-ját 0,4 ml 0,5 M trisz.HCl-ben (pH=6,8) és 0,1 ml pertussiszvakcinában (hővel jelölt 18224 jelű törzs; 20 E/ml; 1:10 000 hígítású tiomerzál) oldottuk fel, s ehhez 0,5 ml komplett Freund-adjuvánt adtunk. Az anyagot fecskendőben homogenizáltuk. A kapott 1 ml-nyi mintával új-zélandi fehér nyulakat immunizáltunk, 0,1 ml (200 µg polipeptid) bőrbe adott injekciókkal.

Körülbelül 4 hónap múlva és ezután időnként emlékeztető oltásokat adtunk úgy, mint fent. A nyulak fül- vagy combvénájából ismétlen vért vettünk, és hagytuk megalvadni.

Egy nyúl szérumból IgG-frakciót izoláltunk úgy, hogy a szérumot 1,5 M glicinpufferrel (pH=8,9) kiegyensúlyozott Protein A-Sepharose oszlopra (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) adszorbeáltuk. A kromatografálást a Forton Biochem. Co. standard módszerének alkalmazásával végeztük. A tisztított anyag tisztaságát SDS poliakrilamid gélelektroforézissel [Laemmli, Nature, 227, 680 (1970)] állapítottuk meg. Az anyag körülbelül 98%-os tisztaságú IgG volt, melynek 343-6 antiszérum IgG-frakció elnevezést adtunk.

Hasonló eljárások alkalmazásával készítettük el az 1. táblázatban szereplő további polipeptidnek elleni antiszérumok IgG-frakcióit.

Az izolált IgG-frakciók ELISA-vizsgálatát úgy végezzük, hogy 96 tartályos mikrotitráló lemezekre

25 (Becton-Dickinson) egy-egy polipeptidből 0,25 µg-ot – 50 µl trisszel pufferolt konyhasóoldatban (TBS: 50 mM trisz, 0,15 M nátrium-klorid; pH=7,0) feloldva – adszorbeálunk 1 órán át szobahőmérsékleten. Az inkubálás után a tartályokat ötször mossuk 0,1% Tween 20 (polioxi-etilén-szorbitán-monolaureát) tartamú TBS-sel.

30 A kimosott tartályokat TBS-ben oldott 1% bovin-szérum albuminnal (BSA) 1 órán át szobahőmérsékleten blokkoljuk, ötször mossuk TBS-sel, 2 órán át szobahőmérsékleten TBS-ben oldott 0,1% nem specifikus IgG-vel blokkoljuk, és ötször mossuk, mint fent leírtuk. Ezután a TBS-ben oldott IgG-frakciók különböző hígításaiból 50 µl-eket mérünk a tartályokba, a lemezeket 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd ugyanúgy mossuk, mint előbb.

40 Ezután minden tartályhoz TBS-ben oldott 2,5 ng torna-peroxidázzal jelzett kecske anti-nyúl IgG-t adunk, és a lemezeket 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk. A lemezeket mossuk, mint fent, és a tartályokat hidrogén-peroxiddal és 2,2'-azino-di(3-etil-benzotiazolin-szulfonát)-tal fejlesztjük ki.

45 A kontrolltartályokat, amelyekből a vizsgálathoz szükséges három komponens közül egy (például antigén vagy antitest vagy jelzett második antitest) hiányzik, szintén kifejlesztjük. A lemezeket Dynatech Model 50 650 spektrofotométer használatával olvassuk le.

A 7-es számú polipeptiddel (1. táblázat) és a humán IL-4-gyel, mint antigénnel és a 343-6 antiszérum IgG-frakcióval végzett vizsgálatok eredményét a 2. ábra mutatja be. Az ábrából, ahol a 414 nm-en mért abszorpciót, azaz az antigénkötődés mértékét a tartályonkénti polipeptid vagy IL-4 mennyisége függvényében ábrázoljuk, látható, hogy az antitest mindkét antigénhez kötődik. Az eredményekhez úgy jutottunk, hogy a 343-6 antiszérum IgG-frakciót 1:200-ra hígítottuk, és ezután fedtük a tartályokat 50 µl alikvot mennyiségeivel.

Annak meghatározására, hogy vajon az anti-polipeptid IgG-frakciókban lévő antitestek specifikusan kötődnek-e humán IL-4-hez, s így gátolják-e az IL-4 kötődését sejtreceptorokhoz, radioligand kötési vizsgálatokat végeztünk.

CHO-sejtekben kifejeződött tisztított humán IL-4-et [Le et al., J. Biol. Chem., 263, 10817 (1988)] ^{125}J -dal jeleztünk Bolton és munkatársai [Biochem. J., 133, 529 (1973)] módszerének módosított változata szerint, Bolton-Hunter-reagenst (DuPont-NEN, Boston, MA, USA) használva. Röviden kifejtve: 2 mCi Bolton-Hunter-reagenst 0,5 μg tisztított IL-4-gyel – 100 μl 50 mM nátrium-foszfát-pufferben; pH=8,0 – reagáltunk 2 órán át 22 °C-on. A reakciót azonos térfogatú 1,0 M glicin hozzáadásával állítjuk le 1 óra alatt.

A jódozott proteint géliszűrővel 0,2% zselatintartalmú 50 mM nátrium-foszfát-oldattal (pH=7,4) egyensúlyba hozott PD-1 oszlopon (Pharmacia, Piscataway, MA, USA) izoláltuk. Az üres térfogattal eluált radioaktív anyagot egyesítettük és analizáltuk. A jelzett IL-4 specifikus radioaktivitása 1500 Ci/mmol volt, melyet a Calvo és munkatársai [Biochem. J., 212, 259 (1983)] szerinti öneltolódási módszerrel határoztunk meg. A moláris beépülési arány 0,68 mol jód/mol protein volt.

A kötési vizsgálatok elvégzése előtt a különböző anti-polipeptid IgG-frakcióknak a kötést elősegítő táptalajjal [RPMI 1640 10% fetális borjúsérummal (FCS)] készített sorozathígításából 0,1 ml-eket a ^{125}J -IL-4 azonos mennyiségeivel (körülbelül 2×10^5 cpm) 1,0 ml kötést elősegítő táptalajban inkubálunk 1,5 ml-es kémcsövekben 18 órán át 4 °C-on. Ezután az előinkubáció után a kémcsövek tartalmát 2×10^6 Daudi-sejttel keverjük, és a keverékeket 2 órán át 4 °C-on inkubáljuk.

Az inkubálás után a sejteket 30 másodpercig 4 °C-on centrifugálással 800 vagy 12 000 g mellett üleptjük, és a felüliszókat eldobjuk. A sejteket 0,1 ml frissen készített kötést elősegítő táptalajban, jelzett IL-4 nélkül, 4 °C-on reszuszpendáljuk, üleptjük, mint fent, 100 μl vizsgálathoz szükséges táptalajban reszuszpendáljuk, és 100 μl dibutil-ftalát és dioktil-ftalát 1:1 elegye fölé rétegezzük. A sejteket 13 000 g mellett 2 percig üleptjük, folyékony nitrogénben lefagyaszttjuk, ezután gamma-számlálóban mérjük. A specifikus kötődést 1,0 mg jelzetlen humán IL-4-et tartalmazó párhuzamos mintákban határozzuk meg.

A fent leírt vizsgálatok eredményét a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat
Anti-polipeptid IgG-frakciók vizsgálata

Antigénként használt polipeptid ^a	Antitest reaktivitása ^b		A ^{125}J -IL-4 kötődés gátlása%-ban
	polipeptiddel	IL-4-gyel	
1	+	-	0
2	+	+	0
3	+	+	2,4

	Antigénként használt polipeptid ^a	Antitest reaktivitása ^b		A ^{125}J -IL-4 kötődés gátlása%-ban
		polipeptiddel	IL-4-gyel	
5	4	+	+	0
	5	+	+	8,7
	6	+	+	76
10	7	+	+	78
	8	+	-	7,5
	9	+	+	39
	10	+	+	26
15	11	+	+	60
	12	+	+	0

^a A polipeptidek aminosav-szekvenciáit és a humán IL-4 molekulán belüli megfelelő szakaszokat az 1. táblázat tartalmazza.

^b Az antitest-reaktivitás meghatározásában a + jel azt jelenti, hogy a 414 nm-en mért abszorpció $>0,05$ a kontrolltartályok abszorpciójának levonása után.

A 2. táblázat adatai azt mutatják, hogy a humán IL-4 52–56 (6-os számú polipeptid), 61–82 (7-es számú polipeptid) és 104–129 (11-es számú polipeptid) csoportjainak megfelelő polipeptidek ellen termelt antitestek erősen gátolták a ^{125}J -IL-4 kötődését Daudi-sejtekhez. Ezek az antitestek az immunizáló polipeptidekhez is és az IL-4-hez is specifikusan kötődnek, ugyanakkor a preimmunsérum egyikhez sem kötődik, és nincs hatása a receptorkötésre.

A 2. táblázatból látható még, hogy a 6-os számú és 7-es számú polipeptid elleni antitestek egyformán hatékonyan gátolják a jelzett IL-4 kötődését. Az 1. táblázatból kitűnik, hogy ezek a polipeptidek egy közös KDTRC aminosav-szekvenciát tartalmaznak. Ezek a bizonyítékok együtt arra engednek következtetni, hogy ez az alszekvencia egy fontos epitópot képez, és ez képezi alapját annak, hogy a találmány szerinti polipeptidek ilyen kevés, azaz 5 aminosavcsoportot is tartalmazhatnak.

A 6-os számú polipeptid elleni monoklonális antitestek által a kötésre kifejtett gátlás különösen érdekes. Mint fent megjegyeztük, Chretien és munkatársai azt találták, hogy az ugyanezen polipeptid elleni monoklonális antitestek nem semlegesítik az IL-4 bioaktivitását. Az alább leírt epitópanalízis azonban kimutatta, hogy ez az antitest valószínűleg a polipeptid aminoterminális vége felé eső csoportok ellen irányul, és nem a karboxi-terminális végnél lévő Lys-Asp-Thr-Arg-Cys alszekvencia ellen. E példa szerinti poliklonális antitest valószínűleg azért gátolta az IL-4-et, mivel a benne lévő néhány antitest ezen specifikus alszekvenciát magába foglaló epitópon ellen irányult.

A 7-es polipeptid elleni 343–6 antisérum IgG-frakcióval kapott eredményeket a 3. ábrán grafikusán ábrázoljuk. A vizsgálatban 2×10^6 Daudi-sejtet 50 pM ^{125}J -IL-4-gyel és a megadott antitest-koncentrációkkal inkubáltunk 2 órán át 4 °C-on. Antitest távollétében a specifikus kötés értéke 3,347 cpm volt. Abból a megfigyelésből, hogy a kötés erősen gátolt volt, és hogy ez

azzal a ténnyel párosult, hogy az antitestek specifikusan kötődtek a 7-es polipeptidhez és IL-4-hez, azt a következtetést vontuk le, hogy azok az aminosavcsoportok, amelyek ellen az antitestek irányultak, az IL-4 felületén helyezkedhettek el.

Monoklonális anti-polipeptid antitestek

A monoklonális antitesteket lényegében a Köhler és Milstein [Nature, 256, 495 (1975)] által leírtak szerint állítottuk elő. Az inkubálásokat 37 °C-on, 5% szén-dioxidot tartalmazó inkubátorban végeztük.

Balb/c egereket (Charles River) 500 µl 2,6,10,14-tetrametil-pentadecán (Pristane) intraperitoneális (i. p.) beadásával immunológiailag szenzitizálunk. Körülbelül négy nappal később a 7-es számú polipeptid (1. táblázat; a humán IL-4 61–82 csoportjainak felel meg) 250 µg-okat oldunk fel 250 µl foszfáttal puffertolt konyhasóoldatban (PBS), ehhez 250 µl komplett Freund-adjuvánt adunk, s az elegyeket homogenizáljuk. Minden egérnek intraperitoneálisan adjuk be az így készített anyagot. Körülbelül egy hónap múlva az egereket emlékeztető oltást kapnak (i. p.), mely 125 µg polipeptidet tartalmaz 1:1 arányban hígított inkomplett Freund-adjuvánsban.

Három vagy négy héttel később kapják az egerek az utolsó (i. p.) oltást, mely 250 µg 7-es polipeptidet tartalmaz PBS-ben oldva. Az immunizálás folyamán időnként próbavért veszünk a farokvénából, melyet ELISA-val analizálunk a fent leírtak szerint. Az utolsó immunizáló oltás utáni negyedik napon az állatokat leöljük, és lépüket eltávolítjuk.

A lépeket két tárgylemez között, 100 µg/ml sztreptomocint és 100 egység/ml penicillint tartalmazó RPMI 1640 táptalajban (RPMI pen/strep táptalaj) maceráljuk, majd átvisszük egy nagy kémcsőbe. A törmelékeket ülepedni hagyjuk 1 percre, majd a cső felső rétegében lévő sejteket átvisszük egy 5 ml-es kémcsőbe. Hozzámérünk az RPMI pen/strep táptalajból 4 ml-t, melyben a sejteket felfuszpendáljuk, és ezután centrifugálással (körülbelül 300 g) üleptítjük 8 percre.

A lépesejtekből és az NS-1 egér-mielomasejtekből (ATCC TIB 18) 5:1 arányú keveréket készítünk. A sejteket egyszer mossuk RPMI pen/strep táptalajjal. Ezután a sejteket, mint előbb, üleptítjük, a táptalajt eldobjuk, majd cseppenként 1 perc alatt hozzáadunk 0,5 ml PEG-et (2 g/liter 75 mM HEPES-pufferben) – molekulatömeg körülbelül 1500 dalton – 37 °C-on, 20 másodpercenként óvatosan rázogatva. A PEG-hozzáadást ismételjük, először 0,5 ml, majd 1,0 ml PEG-oldattal.

A fúzió után a sejteket üleptítjük, és 1–1 percre 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 16,0 és 32,0 ml RPMI pen/strep táptalajjal mossuk. A fuzionált sejteket üleptítjük, mint előbb, és a táptalajt eldobjuk. Ezután 0,2933 mg/ml glutamint és 10% főtális borjúsérumot (FCS) tartalmazó RPMI pen/strep táptalajban kezeletlen egérből származó körülbelül 1×10^5 lépsejtet adunk töltő (feeder) sejtek gyanánt a fuzionált sejtekhez. A sejteket összekeverjük, majd üleptítjük, mint előbb. Az előző napon egérből izolált töltő lépesejteket egy éjszakán át 37 °C-on inkubáljuk glutamin- és FCS-tartalmú RPMI pen/strep táptalajban.

A fuzionált és a töltősejteket együtt tenyésztjük 7 napon át 0,2933 mg/ml glutamin, 10% FCS, 1×10^{-2} M hipoxantin, 4×10^{-5} M aminopterin és $1,6 \times 10^{-3}$ M timidin-tartalmú RPMI pen/strep táptalajban (HAT-táptalaj) 96 tartályos, laposfenekű mikrotitráló lemezek (COSTAR), tartályonként 150 µl-ben. Inkubálás után a tartályokban lévő táptalajt HT-táptalajjal (aminopterinmentes HAT-táptalaj) helyettesítjük, és folytatjuk az inkubálást.

5 Több nap múlva a hibridóma-felülűzőket ELISA-val vizsgáljuk a fent leírtak szerint, kivéve, hogy jelzett anti-egér IgG-antitestet használunk. A pozitív eredményt adó tartályokban lévő hibridómákat HT-táptalajban határhígításos módszerrel klónozzuk.

10 Összesen 382 klónozott hibridómát állítottunk elő ezzel a módszerrel, s ezek közül mindegyik termelt monoklonális antitestet. Miután a hibridómákat ELISA-val szűrtük – a 7-es polipeptidet használtuk antigénként – 12 pozitív sejtvonalat azonosítottunk. Ezek közül tízet találtunk pozitívnak IL-4-gyel szemben, ELISA-szűréssel.

20 A pozitív klónok közül nyolcat Ouchterlony módszerrel szűrtük agarban, standard módszerekkel, immunoglobulin-specifikus antiszérumokkal. Ez a vizsgálat kimutatta, hogy 6 klón IgG1-antitestet, egy klón IgG2a-t és egy klón IgM-antitestet termelt.

Anti-idiotípus antitestek előállítása

30 Anti-idiotípus antitestek előállításához 0,5 ml PBS-ben oldott 1,5 mg 343–6 antiszérum IgG-frakcióhoz – lásd fentebb – hozzáadunk 0,5 ml komplett Freund-adjuvánt, és alapos keveréssel emulgeáljuk. Ezt az anyagot birkába (Dorset keresztezett fajta) oltjuk szubkután. Ezt követően néhány hetes időközönként emlékeztető oltásokat adunk a birkának hasonló módon, kivéve, hogy inkomplett Freund-adjuvánt használunk.

35 Az immunizálás folyamán időnként levett próbavérek ELISA-analízisének antigénként a 343–6 antiszérum IgG-frakciót használjuk – mint fent leírtuk –, kivéve, hogy az immunoglobulinnal való blokkolást kihagyjuk, és 0,5 ng tormaperoxidázzal jelzett számár anti-birka IgG-t használunk második antitest gyanánt. Azt találtuk, hogy az így kapott birka-antiszérum (jele: 1448 antiszérum) specifikusan kötődött a 343–6 nyúl antiszérum IgG-frakcióhoz, de nem kötődött IL-4-hez vagy a 7-es polipeptidhez.

45 Vizsgáltuk, hogy vajon az 1448 jelű birka-antiszérum valóban tartalmaz-e anti-idiotípus antitesteket. Ennek érdekében az antiszérum sorozathígításait radioligand receptorkötési analízisnek vetettük alá, amikor is $^{125}\text{J-IL-4}$ -et és Daudi-sejteket használtunk, mint fent leírtuk. A kapott eredményeket a 4. ábra mutatja be. Minden vizsgált minta 2×10^6 sejtet és 50 pM $^{125}\text{J-IL-4}$ -et (2×10^5 cpm) tartalmazott. Antiszérum nélkül a specifikus kötődés 5,931 cpm volt.

50 A 4. ábrából látható, hogy az 1448 jelű birka-antiszérum erős kompetitív gátlást gyakorolt a jelzett IL-4 sejtekhez való kötődésre, és az alacsonyabb hígításokban a specifikus kötődés több mint 80%-át meggátolta. Ezzel szemben a birka pre-immunszérumnak nem volt hatása az IL-4 kötődésére.

Epitóp-analízis

Annak meghatározására, hogy a 6-os és 7-es polipeptidekben mely aminosavcsoportok játszottak lényeges szerepet az olyan antitestek termelésében, amelyek meg tudták gátolni az IL-4 kötődését a sejtreceptorokhoz, epitóp-analízist végeztünk, lényegében Geysen és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 3998 (1984)] módszere szerint.

A Geysen és munkatársai szerinti módszer kis polipeptidek százainak gyors, párhuzamos szintézisét teszi lehetővé szilárd hordozón, ELISA kivitelezéséhez megfelelő tisztaságban és megfelelő mennyiségben, miáltal a polipeptidek ahhoz a szilárd hordozóhoz tapadnak, amelyen szintetizálódtak. Az ELISA-t általában olyan polipeptideken végeztük, amikor a használt anti-

testeket egy olyan nagyobb polipeptid vagy protein ellen termeltük, amelyeknek az aminosav-szekvenciája magába foglalta a kis polipeptidek aminosav-szekvenciáját. Ha az antitestek a nagyobb immunogénen belül egy olyan epitópra specifikusak, amelyet a kis szintetikus polipeptidek tartalmaznak, az antitestek kötődni fognak a polipeptidekhez, és így ELISA-val kimutathatók.

A Geysen és munkatársai-féle módszert (lásd fent) használva 15 oktapeptidből álló sorozatot szintetizáltunk polietilén tűkön (Cambridge Research Biochemicals Inc., Valley Stream, NY, USA). Ezeknek az aminosav-szekvenciái az aggregátumban felölelik a 7-es polipeptid (megfelel az érett humán IL-4 61-82 csoportjainak) minden csoportját. Ezek oktapeptidek szekvenciáit a 3. táblázat mutatja be.

3. táblázat

Az érett humán IL-4 61-82 aminosav-maradékai közötti oktapeptidek

Oktapeptid	Szekvencia	Megfelelő IL-4 csoportok	Központi csoport*
1	KDTRCLGA	61-68	65
2	DTRCLGAT	62-69	66
3	TRCLGATA	63-70	67
4	RCLGATAQ	64-71	68
5	CLGATAQQ	65-72	69
6	LGATAQQF	66-73	70
7	GATAQQFH	67-74	71
8	ATAQQFHR	68-75	72
9	TAQQFHRH	69-76	73
10	AQQFHRHK	70-77	74
11	QQFHRHKQ	71-78	75
12	QFHRHKQL	72-79	76
13	FHRHKQLI	73-80	77
14	HRHKQLIR	74-81	78
15	RHKQLIRF	75-82	79

* Az oktapeptidek központi csoportját önkényesen olyan módon jelöltük meg, hogy az érett humán IL-4 azon csoportjának a pozíciójához, amelynek az oktapeptidek N-terminális csoportja megfelel, négyet hozzáadtunk.

Hasonló módon készítettünk el egy 17 tű-immobilizált oktapeptidből álló sorozatot, ezek együttesen az érett humán IL-4 47-70 csoportjának megfelelő összes

csoportot felölelték. Ezeknek az oktapeptideknek az aminosav-szekvenciáját a 4. táblázat mutatja be.

4. táblázat

Az érett humán IL-4 47-70 aminosav-maradékai közötti oktapeptidek

Oktapeptid	Szekvencia	Megfelelő IL-4 csoportok	Központi csoport*
1	RAATVLRQ	47-54	51
2	AATVLRQF	48-55	52
3	ATVLRQFY	49-56	53
4	TVLRQFYS	50-57	54
5	VLRQFYSH	51-58	55
6	LRQFYSHH	52-59	56

4. táblázat (folytatás)

Oktapeptid	Szekvencia	Megfelelő IL-4 csoportok	Központi csoport*
7	RQFYSHHE	53–60	57
8	QFYSHHEK	54–61	58
9	FYSHHEKD	55–62	59
10	YSHHEKDT	56–63	60
11	SHHEKDTR	57–64	61
12	HHEKDTRC	58–65	62
13	HEKDTRCL	59–66	63
14	EKDTRCLG	60–67	64
15	KDTRCLGA	61–68	65
16	DTRCLGAT	62–69	66
17	TRCLGATA	63–70	67

* Az oktapeptidok központi csoportját önkényesen olyan módon jelöltük meg, hogy az érett humán IL-4 azon csoportjának pozíciószámához, amelynek az oktapeptid N-terminális csoportja megfelel, négyet hozzáadtunk.

A 7-es számú polipeptid epitóp analízisének elvégzéséhez e polipeptiddel a fentiekben leírt módon immunizált nyúlból kapott, 129–88 jelzésű antiszérumot ELISA-val vizsgáltuk, s antigénként a 3. táblázatban felsorolt polietilén tú-immobilizált oktapeptideket használtuk. A fent leírt vizsgálómódszer szerint azt találtuk, hogy ez az antiszérum erősen gátolja a ^{125}J -IL-4 kötődését Daudi-sejtekhez. Az ELISA-t lényegében a fent leírt módon, a 129–88 jelű antiszérummal, 96 tartályos mikrotitráló lemezekon végeztük, kivéve, hogy a tűket használtuk a tartályokban ahelyett, hogy a tartályokat a szabad antigénnel fedtük volna. A tűket eltávolítottuk a tartályokból, mielőtt a színt a Titertek MCC 340 ELISA lemezleolvasóval leolvastuk.

Ennek az analízisnek az eredményét az 5. ábrán mutatjuk be, ahol az oktapeptidekre vonatkoztatott 414 nm-en mért abszorpciót ábrázoljuk. Az 5. ábrán szereplő oktapeptidek száma egyezik a 3. táblázat számaival. Az 5. ábrán látható, hogy az 5–12 oktapeptidekhez erősen kötődnek az antitestek. Utalással a 3. táblázatra látható, hogy ezeknek az oktapeptideknek a körülbelüli közepe az érett humán IL-4 69–76 csoportjainak felel meg. Ezek az adatok, azzal a ténnyel együtt, hogy a 129–88 jelű antiszérum gátolta a jelzett IL-4 kötődését sejtreceptorokhoz, arra utalnak, hogy az érett humán IL-4 69–76 csoportjai epitópot (epitópokat) alkotnak, és az ezen epitóp elleni antitestek gátolják a humán IL-4 kötődését a sejtreceptorokhoz.

A 4. táblázatban szereplő immobilizált oktapeptideket hasonló módon használtuk a 6-os számú polipeptid ellen termelt nyúl-antiszérum analízisére. Ezt az antiszérumot – jele: 342–6 – kétszer ellenőriztük arra nézve, hogy képes-e gátolni a ^{125}J -IL-4 kötődését Daudi-sejtekhez. Az immunizálás korai szakaszában vett szérumminták (342–6 korai antiszérum) nem gátolták a jelzett IL-4 kötődését; a későbbi szérumminták (342–6 késői antiszérum) erős gátlást mutattak. Ennek az analízisnek az eredményét a 6A, illetve a 6B ábra mutatja be. A 6A ábra a korai antiszérummal, a 6B ábra

a késői antiszérummal kapott eredményeket ábrázolja. A 6. ábrán látható oktapeptidek számozása megfelel a 4. táblázat számainak.

25 A 6A ábrából kitűnik, hogy a 6-os polipeptiddel szembeni nem gátló 342–6 korai antiszérum olyan antitesteket tartalmaz, amelyek a 3–7 és 9–13 oktapeptidekkel reagálnak. Utalva a 4. táblázatra, látható, hogy ezeknek az oktapeptideknek a közepe nagyjából az érett humán IL-4 53–57, illetve 59–63 csoportjainak felel meg.

30 A gátló 342–6 késői antiszérum hasonló kötési képet mutat (6B ábra), kivéve, hogy ez olyan antitesteket is tartalmaz, amelyek erős gátló hatást fejtenek ki a 11–6 oktapeptidekre, amelyeknek a közepe a humán IL-4 61–66 csoportjainak felel meg. A 6. ábra A és B táblájának adatait összegezve azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az érett humán IL-4 61–66 csoportjai egy epitópot alkotnak. Az ezen epitóp elleni antitestek gátolják a humán IL-4 kötődését sejtreceptorokhoz.

40 Ezt a feltevést olyan ELISA-vizsgálatok erősítették meg, amelyeket a fent leírtak szerint végeztünk a 6-os és 7-es polipeptidek és a 7-es polipeptid elleni egyik monoklonális antitest használatával. Ez az antitest erősen kötötte mindkét polipeptidet, és ugyancsak erősen gátolja a ^{125}J -IL-4 kötődését Daudi-sejtekhez. A polipeptidekben az egyetlen közös szekvencia a KDTRC, amely az érett humán IL-4 61–65 csoportjainak felel meg. Ebből következik, hogy e gátló monoklonális antitest ez ellen az alszekvencia ellen irányul, és hogy ez az alszekvencia egy fontos epitópot képez.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

55 1. Eljárás polipeptid előállítására, amely 5–26 aminosav-maradékot tartalmaz, és aminosav-szekvenciája megfelel a humán IL-4 61–82 aminosav-maradékokból álló szekvenciájának vagy ennek egy alszekvenciájának, vagy a humán IL-4 104–129 aminosav-mara-

dékokból álló szekvenciájának, *azzal jellemezve*, hogy a polipeptidet a megfelelő aminosav-maradékokból egy peptidszintézisben ismert eljárással megszintetizáljuk, és adott esetben kovalens kötéssel egy hordozómolekulához kapcsoljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a polipeptidet szilárd fázisú peptidszintézissel állítjuk elő.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a polipeptidet kovalensen hozzákötjük egy hordozómolekulához.

4. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az alábbi aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptideket állítjuk elő:

Lys-Asp-Thr-Arg-Cys,
 Thr-Ala-Gln-Gln-Phe-His-Arg-His,
 Lys-Asp-Thr-Arg-Cys-Leu-Gly-Ala-Thr-Ala-
 Gln-Gln-Phe-His-Arg-His-Lys-Gln-Leu-Ile-Arg-
 Phe vagy
 Ala-Asn-Gln-Ser-Thr-Leu-Glu-Asn-Phe-Leu-
 Glu-Arg-Leu-Lys-Thr-Ile-Met-Arg-Glu-Lys-
 Tyr-Ser-Lys-Cys-Ser-Ser.

5. Eljárás az 1. igénypont szerint előállított polipeptid elleni poliklonális antitestek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy 1. igénypont szerint előállított polipeptiddel egy donorállatot immunizálunk, kívánt esetben egy vagy több emlékeztető oltás után az állatból vért veszünk, majd szérumot készítünk, amelyet standard módszerekkel szűrünk, amelyben az említett polipeptidet használjuk antigénként.

6. Eljárás az 1. igénypont szerint előállított polipeptid elleni monoklonális antitestek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy donorállatot egy 1. igénypont szerint előállított polipeptiddel immunizálunk, immunkompetens B-sejteket izolálunk az immunizált donor-

állatból, a B-sejteket mieloma-sejtvonalakkal fuzionáltatjuk, és a keletkező hibridómák közül szelektáljuk az említett polipeptid-antigént felismerő antitesteket termelő hibridómasejteket, az így kapott hibridómasejteket tenyésztjük, és a termelt monoklonális antitestet a tenyésztőtől elválasztjuk.

7. Eljárás humán IL-4 sejtreceptorokhoz való kötődésének gátlására, *azzal jellemezve*, hogy az IL-4-et egy 5. vagy 6. igénypont szerint előállított antitesttel érintkeztetjük.

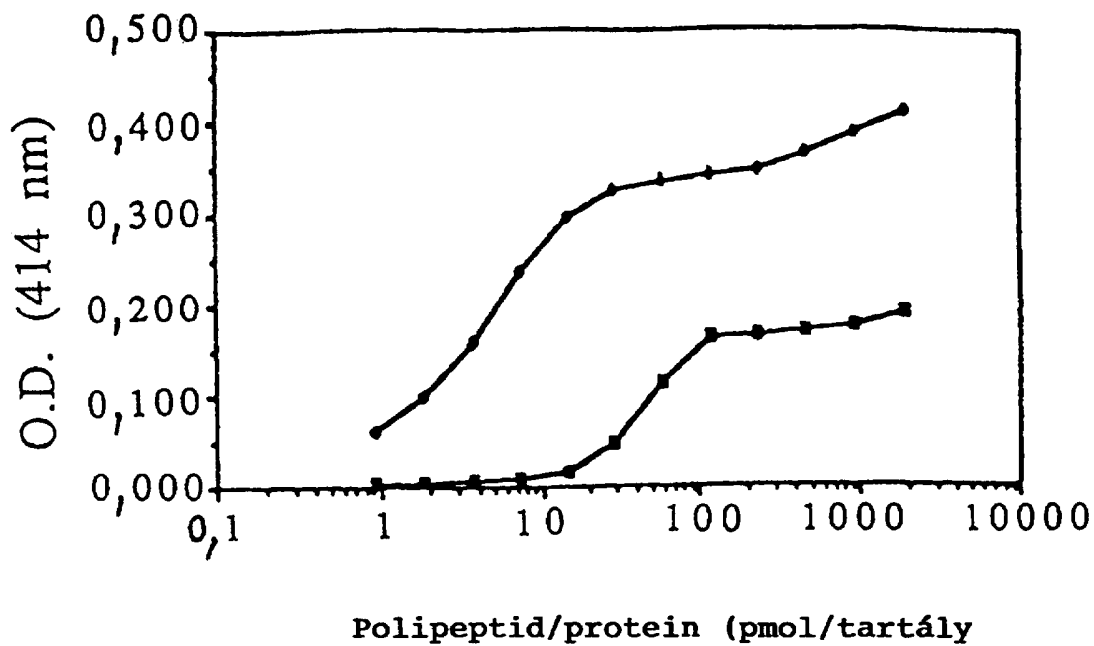
8. Eljárás IL-4 közvetítette allergiák vagy más állapotok kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy vagy több, 5. vagy 6. igénypont szerint előállított antitest hatékony mennyiségét fiziológiás szempontból elfogadható hordozóval összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

9. Eljárás anti-idiotípus antitestek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy állatot egy 5. igénypont szerint előállított poliklonális vagy egy 6. igénypont szerint előállított monoklonális antitesttel immunizálunk, és az immunizált állat véréből az anti-idiotípus antitesteket standard eljárásokkal teljes poliklonális antiszérum formájában vagy ennek egy IgG-frakciója formájában, vagy hibridómák által termelt monoklonális antitestek formájában kinyerjük.

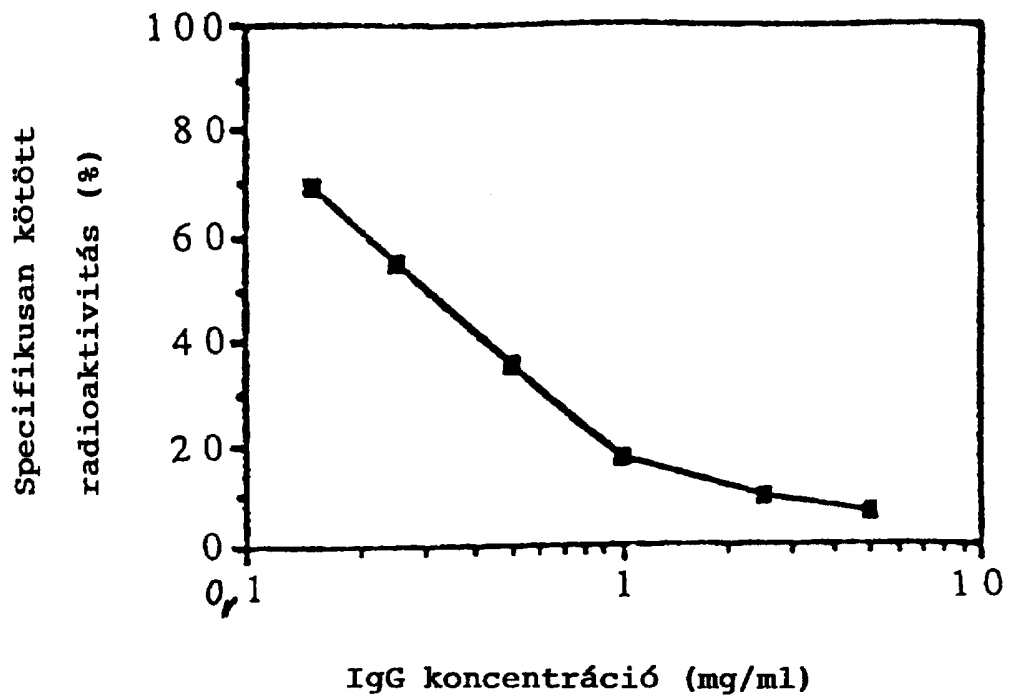
10. Eljárás humán IL-4 sejtreceptorokhoz való kötődésének gátlására, *azzal jellemezve*, hogy az IL-4 receptorokat hordozó sejteket egy 9. igénypont szerint előállított anti-idiotípus antitesttel érintkeztetjük.

11. Eljárás IL-4 közvetítette allergiák vagy más állapotok kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy vagy több 9. igénypont szerint előállított anti-idiotípus antitest hatékony mennyiségét fiziológiás szempontból elfogadható hordozóval összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

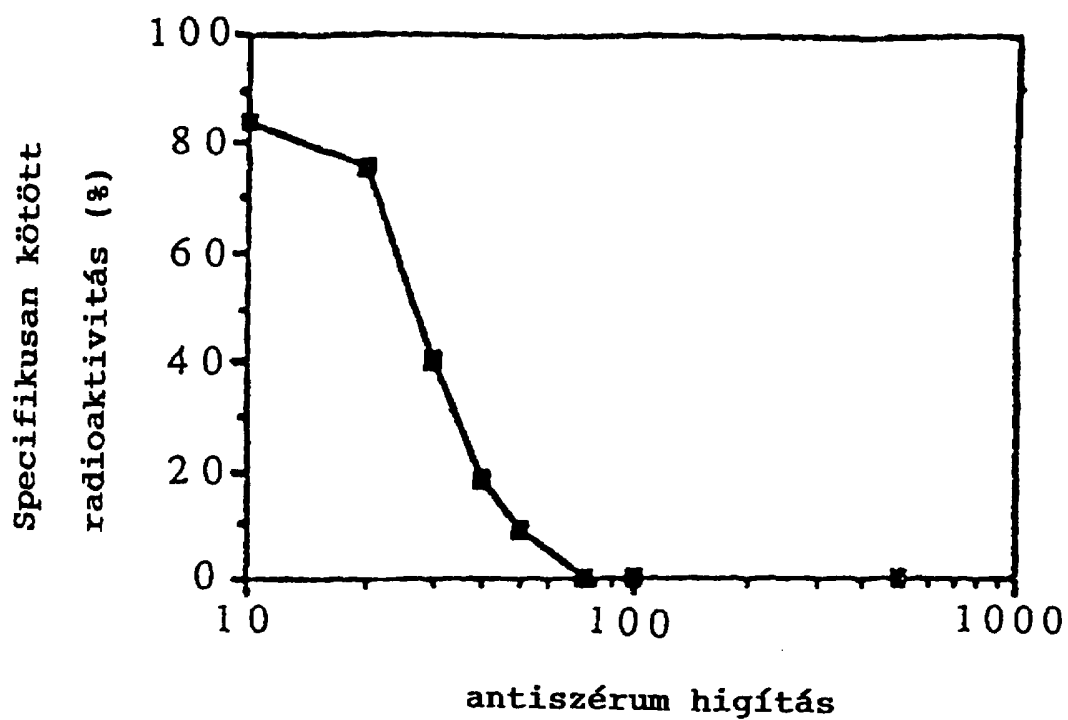
2. ábra



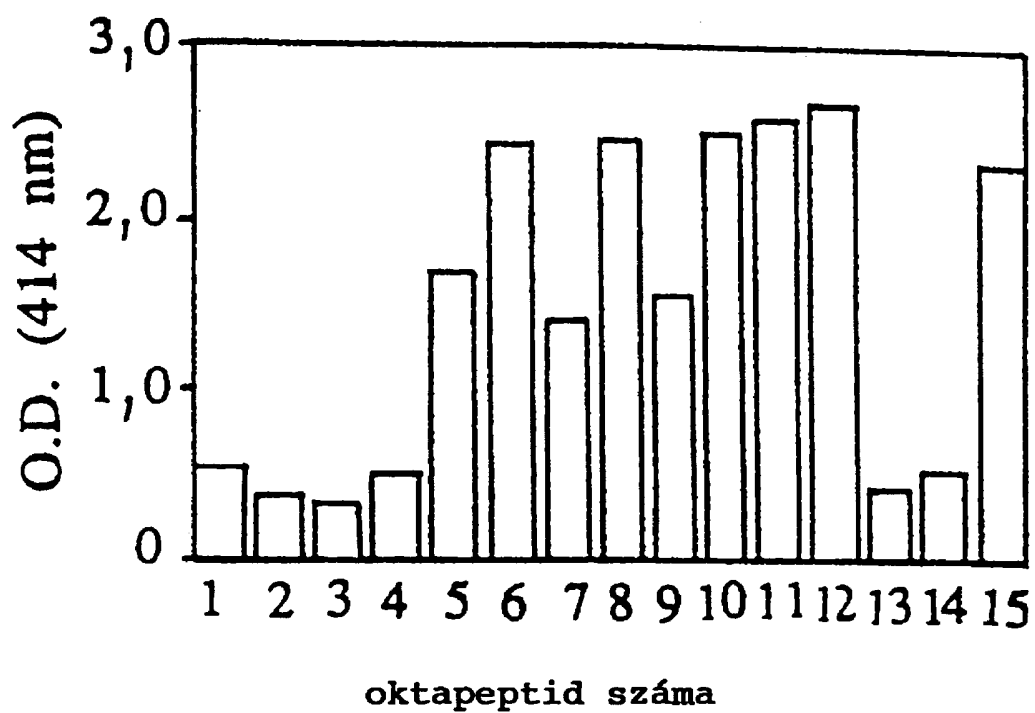
3.ábra



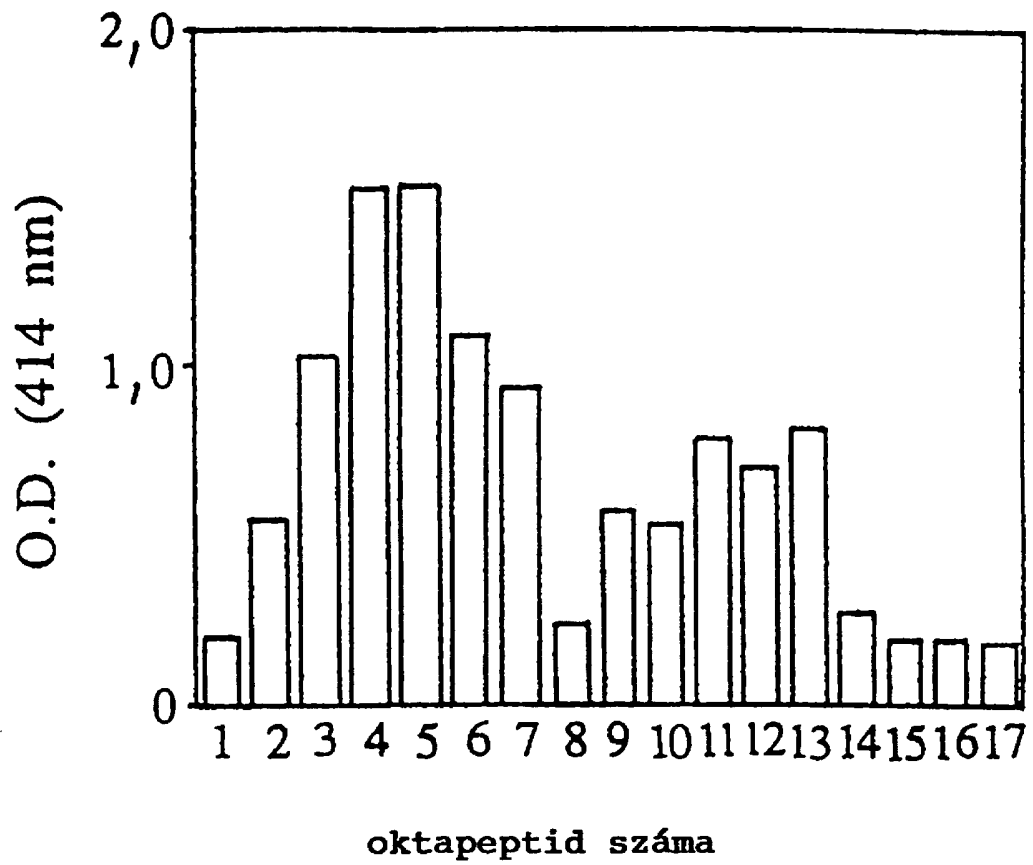
4. ábra



5. ábra



6A. ábra



6B. ábra

