

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

27527

**Mammaglobin, egy szekretált emlő-specifikus mell-
rák fehérje**

K I V O N A T

A találmány tárgya emlő-specifikus fehérjét kódoló cDNS-szekvencia, valamint a szekvencia által kódolt emlő-specifikus fehérje, amely alkalmas mellrák kimutatására és kezelésére. A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti fehérjét tartalmazó vakcina is.

fehérje

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

**Mammaglobin, egy szekretált emlő-specifikus mell-
rák fehérje**

A találmány tárgyköre általánosságban a mellrák patogenezisének területe, a találmány tárgyát pedig közelebbről olyan cDNS-szekvencia, valamint a szekvencia által kódolt emlő-specifikus fehérje képezi, amely alkalmazható mellrák kimutatására és kezelésére. A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti fehérjét tartalmazó vakcina is.

A mellrák egyike a leggyakoribb és potenciálisan halálos kimenetelű rákbetegségeknek.

Bár a korai diagnózis és kezelés csökkenteni képes a megbetegedések számát és a betegség okozta halálozások számát, a mammográfia pozitív előrejelző képességét csupán körülbelül 25%-ra becsülik [Hall és mtsai.: N. Eng. J. Med. 327 319 (1992), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő]. Ezért tehát szükség van olyan

módszerre, amellyel a rák korábban kimutatható, mint ahogy a rák mammográfia segítségével felismerhető és egy genetikai vagy biokémiai marker feltételezhetően képes lenne ilyen módszert biztosítani, hogy kiegészítse és megnövelje a mammográfia előrejelző képességét [Hayes: Hematol. Oncol. Clin. N. Am. 8 485 (1994), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő].

A mellrák kifejlődését számos genetikai változás kíséri [ennek összefoglalását lásd: Porter-Jordan: Hematol. Oncol. Clin. N. Am. 8 73 (1994), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő]. Az ilyen változások közé tartoznak makroszkopikus kromoszóma rendellenességek és genetikai markerek elvesztése [Devilee és mtsai.: Biochim. Biophys. Acta 1198 113 (1994); Callahan és mtsai.: J. Cell Biochem. Suppl. 17 167 (1993)], amely referenciák teljes egészükben a kitanítás részének tekintendők]. Az emlő neoplázia progressziójáról azt is kimutatták, hogy kvalitatív és kvantitatív változásokat eredményez olyan korábban azonosított gének expressziójában, amelyek növekedési faktorokat és azok receptorait kódolják [Zajchowski és mtsai.: Cancer Res. 48 7041 (1988), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő]; szerkezeti fehérjéket kódolnak [Trask és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 2319 (1990), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő]; másodlagos hírvivő fehérjéket kódolnak [Ohuchi és mtsai.: Cancer Res. 26 2511 (1986), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő] és transzkripciós faktorokat kódolnak [Harris: Adv.

Cancer Res. 59 69 (1992), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő]. Ezek a változások a gén expresszióban potenciálisan alapját képezhetik mellrák marker kifejlesztésének, bár a páciens biopszia mintákban ezen gén változások pontos szerepe az emlő karcinóma patogenezisében nem teljesen ismert.

Továbbá a betegség korai kimutatására szolgáló genetikai vagy biokémiai mellrák marker biztosítása mellett az is kívánatos lenne, hogy olyan tumor markerrel rendelkezünk, amely biztosítja a prognózis értékelését, a gyógykezelés kiválasztására és értékelésére szolgáló módszert biztosít, és lehetőséget teremt a gyógykezelés irányítására. Bár számos szöveti markert azonosítottak már, egyik sem kellően érzékeny vagy tumor specifikus, hogy ideálisan alkalmas legyen a diagnózishoz vagy a népesség általános szűrésére [lásd fentebb]. Így tehát továbbra is szükségünk van mellrák markerre - mint például egy génre, az expresszált fehérjével együtt - amely alkalmazható mellrák megjelenésének és patogenetikus fejlődésének specifikus és szelektív azonosítására egy páciensben és amely alkalmazható tumor-specifikus immunterápiában.

Egy módosított differenciális kimutatási ("differential display") polimeráz láncreakciós eljárást alkalmazva eltérően expresszált szekvencia jelölők ("tags") izolálására emlő karcinómából számos olyan szekvencia fragmenst izoláltunk, amely egyedülálló módon került expresszióra neoplázias emlő epitél szövetben, a normál szöveti kontrollokkal összevetve [Watson és Fleming: Cancer Res. 54 4598 (1994),

amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő]. Az egyik ilyen szekvencia jelölő felfedezése - amelyre a későbbiekben mint DEST002 hivatkozunk - az új, teljes hosszúságú cDNS és a kódolt fehérje - amelyre a későbbiekben mint mammaglobin hivatkozunk - felfedezéséhez és izolálásához vezetett. Mind a cDNS és a fehérje új.

Röviden összefoglalva tehát a találmány tárgyát új génnek azonosítása képezi, amelyek expressziója mellrák esetén megnövekszik és az ezen génekből származó mRNS-ből származtatható cDNS-ek izolálása képezi. Ennek megfelelően a feltalálók sikeresen új cDNS-t és az általa kódolt emlő-specifikus kiválasztásra kerülő fehérjét, a mammaglobint fedezték fel. A cDNS tisztított és izolált formában került előállításra és nukleotid szekvenciáját az 1. azonosítási szám szerinti szekvencia mutatja be; a kódolt fehérje - mammaglobin - tisztított és izolált formában került előállításra és aminosav szekvenciáját a 2. azonosítási szám szerinti szekvencia mutatja be.

A mammaglobin túlexpresszióra kerül az I. fázisú primer mellrák tumorok 27%-ban. Ez arra utal, hogy a mammaglobin gén szabályozásának szétesése korai szakaszban és gyakran fordul elő mellrák esetében. A mammaglobin és a hozzá tartozó cDNS felfedezése tehát alapul szolgálhat új eljárások és készítmények kifejlesztésére a mellrák kimutatásához és kezeléséhez emberekben és más emlősökben.

Így a találmány tárgyát képezik továbbá emlő neoplázia sejtek jelenlétének mintában történő kimutatására szolgáló új eljárások. A találmány egy megvalósítási módja szerint

mammaglobint kódoló cDNS-t vagy a cDNS származékát alkalmazzuk mammaglobin jelenlétének kimutatására a mintában. Az eljárás során a következő lépéseket hajtjuk végre: (a) az 1. azonosítási szám szerinti nukleotid szekvenciát tartalmazó polinukleotidot vagy annak származékát biztosítjuk; (b) a nukleotid szekvenciát a mintával olyan körülmények között inkubáljuk, hogy a szekvencia hibridizálni képes emlő neoplázia sejtekből származó mRNS-sel; és (c) DNS-RNS hibridizációs komplex jelenlétét mutatjuk ki.

Egy másik aspektus szerint a találmány tárgyát képezi továbbá emlő neoplázia sejtek hibridizáció segítségével mintában történő kimutatására szolgáló reagenskészlet is. A reagenskészlet tárolóedénybe kiszerelve olyan polinukleotidot tartalmaz, amely az 1. azonosítási szám szerinti nukleotid szekvenciával vagy annak származékával rendelkezik.

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint egy mintában a mammaglobin expresszióját oly módon határozzuk meg, hogy kimutatjuk a mintában található mammaglobin mRNS-ről reverz transzkripcióval előállítható cDNS jelenlétét. Az eljárás során a következő lépéseket hajtjuk végre: (a) páciensből származó mintából a reverz transzkripció módszer alkalmazásával mRNS-ből mammaglobint kódoló cDNS-t állítunk elő; (b) két olyan primert biztosítunk a polimeráz láncreakciós eljáráshoz, amelyek a mammaglobint kódoló cDNS belsejében elhelyezkedő vagy azt határoló oligomereket tartalmaznak; és (c) a polimeráz láncreakciós módszer segítségével amplifikáljuk a cDNS-t kódoló mammaglobint. A két primer a 3. azonosítási szám szerinti szekvenciát és a 4.

azonosítási szám szerinti szekvenciát tartalmazó nukleotid szekvenciákkal rendelkezik.

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint reagenskészletet hozunk létre emlő neoplázia sejtek jelenlétének a polimeráz láncreakció segítségével történő kimutatására mintában. A reagenskészlet két primert tartalmaz a polimeráz láncreakciós eljáráshoz, amelyek tartóedényben kisserelve olyan oligomereket tartalmaznak, amely oligomerek a mammaglobin kódoló cDNS belsejében vagy azt határolva helyezkednek el. A két primer a 3. azonosítási szám szerinti szekvenciát és a 4. azonosítási szám szerinti szekvenciát tartalmazó nukleotid szekvenciákkal rendelkezik.

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint tumor sejt által expresszált mammaglobin fehérje jelenlétét mutatjuk ki mintában a mammaglobin fehérje elleni specifikus antitesteket alkalmazva. A specifikus antitestek lehetnek poliklonális vagy monoklonális eredetű antitestek.

A találmány tárgyát képezik továbbá új készítmények és eljárások emlő neopláziás megbetegedésének kezelésére olyan mammaglobin-antigének alkalmazásával, amelyek képesek antitest közvetített és/vagy sejt közvetített - azaz aktivált T-sejtek segítségével létrejövő - immunválaszt indukálni mammaglobin expresszáló tumor ellen.

A találmány egy megvalósítási módja szerint a találmány szerinti készítményben olyan mammaglobin B-sejt antigént alkalmazunk, amely képes mammaglobin specifikus B-sejteket aktiválni. A B-sejt antigén mammaglobin specifikus B-sejt epitópot és T_H epitópot vagy determinánst tartalmaz, ame-

lyet a T-helper sejtek felismernek.

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint mammaglobin-antigénként mammaglobin specifikus citotoxikus T-limfociták által felismert mammaglobin T_c-sejt antigént alkalmazunk, amely T_c-sejt epitópot és kötő helyet vagy agretópot tartalmaz MHC I. osztályba tartozó molekulák számára.

A találmány egy ismét másik megvalósítási módja szerint eljárva a találmány szerinti készítményben B-sejt és T_c-sejt antigéneket alkalmazunk.

Mammaglobint expresszáló tumorra rendelkező páciens kezelésére szolgáló eljárások közé tartozik az alkalmazkodó immunterápia, amelynek során a páciensből izolált mammaglobin specifikus limfocitákból származó mammaglobin-antigénnel *ex vivo* stimulálunk és ezt követően az aktivált limfocitákat a betegnek beadjuk és *in vivo* anti-mammaglobin immunválaszt stimulálunk, amelynek során a páciensnek mammaglobin-antigént tartalmazó vakcinát adunk be.

A találmány számos előnyös megvalósítási módja által biztosított között kiemeljük olyan nukleotid szekvencia és az általa kódolt aminosav szekvencia biztosítását, amelyek markerként szolgálhatnak mellrák sejtek esetében; kiemeljük eljárások biztosítását emlő neoplázia sejtek jelenlétének korai kimutatására; kiemeljük a mellrák kimutatásának azon módjait, amelyek kiegészíthetik a mammográfiát és megnövelik annak előrejelző képességét; kiemeljük olyan eljárások biztosítását, amelyek segítséget nyújtanak a prognózis becslésében; kiemeljük olyan markerek biztosítását, amelyek

lehetővé teszik a terápia célirányos megvalósítását; és kiemeljük olyan készítmények biztosítását, amelyek képesek sejtes és humorális immunválasz stimulálására a tumoral szemben.

Az 1. ábra a teljes hosszúságú mammaglobin cDNS izolálására alkalmazott stratégiát mutatja be, amely magába foglalja a cDNS végek gyors amplifikálása (Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE) polimeráz láncreakció (PCR) technikát és az ezt követő szubklónozást a pGEM7Z és pCEV27 vektorokba.

A 2. ábra az 1. azonosítási szám szerinti humán cDNS szekvenciát mutatja be (a nukleotidok számozása felül) és a kódolt emlő-specifikus fehérje, mammaglobin aminosav szekvenciáját (2. azonosítási szám szerinti szekvencia, az aminosavak számozása alul), a kitöltött sáv a RACE PCR eljárás segítségével izolált 403 bázispár hosszúságú fragmenst jelzi (5. azonosítási szám szerinti szekvencia), míg az üres sáv a 206 bázispár hosszúságú DEST002 szekvenciát (6. azonosítási szám szerinti szekvencia) jelzi.

A 3. ábra az emlő-specifikus fehérje, mammaglobin aminosav szekvenciáját mutatja be (hMAM, 2. azonosítási szám szerinti szekvencia) összehasonlítva a patkányból származó prosztata eredetű szteroidkötő fehérje C3-alegységgel (rPSC3, 7. azonosítási szám szerinti szekvencia) valamint a humán klara (clara) sejtből származó 10 kDa molekulatömegű fehérjével (hCC10, 8. azonosítási szám szerinti szekvencia), az azonosságokat félkövér betűvel és kettős vonalakkal jelöljük, míg a szerkezetileg hasonló aminosavakat egy-

szeres vonalakkal jelöljük.

A 4. ábra (A) panelja az emlő neoplázia, normál emlő szövetek és más felnőtt szövetek által expresszált mRNS és az emlő-specifikus fehérjét, mammaglobint (hMAM) kódoló humán cDNS szekvencia hibridizációjának Northern-blott analízisét mutatja be, és a (B) panel az emlő neoplázia, normál emlő szövetek és más felnőtt szövetek RT/PCR amplifikált mintáinak analízisét mutatja be.

Az 5. ábra az emlő-specifikus cDNS szekvencia transzlációját mutatja be *in vitro* nyúl retikulocita lizátum vizsgálati rendszerben.

A 6. ábra a mammaglobint kódoló cDNS Northern-blott hibridizációját mutatja be, mRNS kimutatását jelezve 2410-tumorban, nyolc további páciens közül háromból származó tumorban (félkövéren szedve) és kisebb mértékben normál emlőszövetben (dőlt betűkkel szedve); és két esetben összehasonlítást mutat be (a jobboldalon látható négy sáv) a mammaglobin mRNS expresszió között tumor szövetben és a páciensnek megfeleltetett normál szövetben.

A 7. ábra Western-blott analízist mutat be a mammaglobin C-terminális (14. azonosítási szám szerinti szekvencia) ellen kifejlesztett poliklonális antitest alkalmazásával MDA-MB-415 emlőtumor sejtekből kondicionált táptalajon (S) és sejt lizátumon (C), az immunizáló peptid hiányában (-) és jelenlétében (+), amely sorrendben megfeleltetve a mammaglobin fehérje prekuzort és szekretált formáit mutatja ki a sejt táptalajban és a sejt lizátumban.

A 8. ábra Western-blott analízist mutat be MDA-MB-415 emlőtumor sejtekből a kondicionált táptalajon (S) és a sejt lizátumon (C) végezve anti-mammaglobin poliklonális antitest segítségével, amely sejteket tunicamicin - az antibiotikum megakadályozza a glikozilációt - hiányában (-) és jelenlétében (+) növesztettünk, amelynek következtében hiányzik a kimutatható mammaglobin fehérje a sejtek lizátumában vagy táptalajában amelyekben az N-kapcsolt glikoziláció gátlott.

A 9. ábra humán emlőtumor sejtekből származó sejt lizátumok Western-blott analízisét mutatja be, feltüntetve az anti-mammaglobin poliklonális antitest és a kecske eredetű, nyúl elleni antitest segítségével kimutatott prekursor mammaglobin fehérjét, ahol az immunreakciót enzim-kapcsolt kemilumineszcencia segítségével tettük láthatóvá.

A 10. ábra Western-blott analízist mutat be az anti-mammaglobin poliklonális antitest alkalmazásával humán emlőből származó, terhesség során és szülés után nyert folyadék szekréciókon, a szekretált mammaglobin fehérjét kimutatva proliferáló emlőmirigyben.

A 11A. ábra színes képen mutatja be páciensből származó mintából nyert mellrák sejtek paraffin-fixált metszetét, amelyet immunhisztokémiai módszerekkel festettünk meg az anti-mammaglobin poliklonális antitestet és kecske eredetű nyúl elleni antitestet alkalmazva, amelyet torna-peroxidázzal jelöltünk és szubsztrátként DAB-ot alkalmaztunk; a mammaglobin fehérjét expresszáló sejtek barna színű festődést mutatnak.

A 11B. ábra fekete-fehérben mutatja be páciensből származó mintából nyert mellrák sejtek paraffin-fixált metszetét, amelyet immunhisztokémiai módszerekkel festettünk meg az anti-mammaglobin poliklonális antitestet és kecske eredetű nyúl elleni antitestet alkalmazva, amelyet tormaperoxidázzal jelöltünk és szubsztrátként DAB-ot alkalmaztunk; a mammaglobin fehérjét expresszáló sejtek barna színű festődését külön megjelöltük.

A találmány egy aspektusa szerint a találmány tárgyát képezi az 1. azonosítási szám szerinti szekvenciával jellemzett cDNS azonosítása és szekvenálása, amely a 2. azonosítási szám szerinti szekvenciával jellemzett emlő specifikus szekretálódó fehérjét, a mammaglobint kódolja (2. ábra). Ahogyan ez az alábbiakban leírásra kerül, a teljes hosszúságú mammaglobin cDNS-t tumorsejt mRNS-ből kiindulva izoláltunk, amelynek során a mRNS reverz transzkripcióra került, PCR technika alkalmazásával amplifikáltuk és expressziós vektorokba szubklónoztuk. Továbbá a cDNS által kódolt fehérjét, a mammaglobint azonosítottuk és jellemeztük.

Az anonim szekvencia jelölőt alkalmazva - amelyet korábban a DEST002 elnevezéssel láttuk el - kimutattuk, hogy a megfelelő géntermék - amely mindmostanáig ismeretlen volt de itt mammaglobinként azonosítottuk - különösen nagy mennyiségben fordul elő az MDA-MB-415 mellrák tumor sejtvonalban. A teljes hosszúságú mammaglobin cDNS izolálása érdekében az ezen sejtvonalból származó mRNS-t reverz transzkripcióba vittük és a RACE PCR eljárás segítségével klónoztuk

[Edwards és mtsai.: Nucleic Acids Research 19 5227 (1991), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő]. Ezen eljárás alapvető stratégiája szerint egyszálú oligo-deoxi-ribonukleotidot ligálunk egyszálú cDNS 3'-végéhez. A mammaglobin cDNS izolálására szolgáló eljárást vázlatosan az 1. ábrán mutatjuk be.

A teljes hosszúságú 503 bp nagyságú cDNS szekvenciát (1. azonosítási szám szerinti szekvencia) az ezen eljárás segítségével izolált 403 bp nagyságú fragmensből (5. azonosítási szám szerinti szekvencia, 2. ábra) nyert szekvencia információból és hasonlóképpen a korábbi vizsgálatunkban a megfelelő DEST szekvenciából (DEST002, 6. azonosítási szám szerinti szekvencia, 2. ábra) ezt megelőzően nyert szekvencia információból vezettük le [Watson és Fleming; lásd fentebb]. Az 503 bp nagyságú cDNS-en belül egy 279 bp nagyságú nyílt leolvasási fázis található, amely 93 aminosavból álló polipeptidet kódol és előre jelezhető molekulatömege 10,5 kDa (2. azonosítási szám szerinti szekvencia, 2. ábra). Ennek a nyílt leolvasási fázisnak a kezdő metioninja egy csaknem tökéletes Kozak-féle konszenzus szekvencián belül helyezkedik el [Kozak: Cell 22 7 (1980); amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő]. Az ezen szekvenciától 5'-irányban elhelyezkedő 60 bázispár nem tartalmaz semmilyen más, leolvasási fázisban elhelyezkedő metionint vagy transzlációs stop szekvenciát. A cDNS 3'-irányban elhelyezkedő transzlációra nem kerülő szekvenciája 163 bázispárt tartalmaz, és egy poliadenilációs szignált - AATAAA - tartalmaz 12 bp távolságra 5'-irányban az eredeti

DEST002 szekvencia kezdő helyétől. Ezek az adatok azt jelzik, hogy sikerült izolálni a teljes hosszúságú mammaglobin cDNS-t. A kódolt polipeptidben található első 19 aminosav alapján hidrofób peptid szignál szekvenciára következtethetünk és az 53-55. aminosavak valamint a 68-70. aminosavak konszenzus N-kapcsolt glikozilációs helyek, ezzel jelezve, hogy a mammaglobin egy szekretált glikoprotein.

A mammaglobin cDNS szekvenciához hasonló DNS szekvenciák keresése a GenBank-ban, a BLAST algoritmus alkalmazásával [Benson és mtsai.: Nucl. Acid Res. 21 2963 (1993); Altschul és mtsai.: J. Mol. Biol. 215 403 (1990), amely referenciák teljes egészükben a kitanítás részének tekintendők], nem azonosított nyilvánvaló DNS szekvencia homológiákat. Így tehát a mammaglobin cDNS-ről feltételezhetjük, hogy új és ezért ismeretlen DNS szekvencia.

A mammaglobinnal rokon szekvenciákkal rendelkező, további polipeptidekre irányuló keresés aminosav szekvencia homológiát tárt fel a mammaglobin és más polipeptidek között. A mammaglobin 42%-os aminosav azonosságot mutatott (58%, ha bele vesszük a konzervatív szubsztitúciókat is) patkány prosztata eredetű szteroid kötő fehérje (prosztat-in) C3-alegységgel (rPSC3, 3. ábra, 7. azonosítási szám szerinti szekvencia). A patkány prosztata eredetű szteroid kötő fehérje egy fő szekretálódó fehérje a patkány ventrális prosztatában, amely két különböző dimer alegységből - C3/C1 és C3/C2 - álló tetramer fehérjét tartalmaz [Parker és mtsai.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 438 115 (1984); Parker és mtsai.: J. Steroid Biochem. 20 67 (1984), amely

referenciák teljes egészükben a kitanítás részének tekintendők]. A C1, C2 és C3 gének mind körülbelül 6 kDa nagyságú szekretálódó fehérjéket kódolnak és feltételezhetően gén kettőződésből erednek, de míg a C1 és C2 gének egymással erős homológiát mutatnak, sokkal kisebb mértékben hasonlítanak a C3 génre. Ennek megfelelően a mammaglobin nem mutat szekvencia homológiát a C1 vagy C2 fehérjékkel.

Ahogyan ezt fentebb megjegyeztük, a prosztata eredetű szteroid kötő fehérje (prostatein) a fő szekretálódó fehérje a patkány ventrális prosztatában és expresszióját androgén szteroidok szabályozzák [Parker és mtsai.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 438 115 (1984); Parker és mtsai.: J. Steroid Biochem. 20 67 (1984), amely referenciák teljes egészükben a kitanítás részének tekintendők]. Egy másik fehérjéről, a humán esztramusztin-kötő fehérjéről (hEMBP) leközölték, hogy expresszálódik a humán prosztatában, humán mellrák esetében és humán malignus melanómában [Bjork és mtsai.: Cancer Res. 42 1935 (1982); Bjork és mtsai.: Anticancer Res. 11 1173 (1991), amely referenciák teljes egészükben a kitanítás részének tekintendők]. A humán esztramusztin-kötő fehérje immunkémiaiilag hasonló a patkány esztramusztin-kötő fehérjéhez, amelyről már kijelentették, hogy azonos a patkány szteroid-kötő fehérjével, a prostateinnel. Ahogyan ezt fentebb megjegyeztük, a mammaglobin aminosav szekvenciája 42% aminosav azonosságot és 58% homológiát mutatott, amennyiben beleértjük a konzervatív szubsztitúciókat a prostatein C3 alegységével. Így elképzelhető, hogy a mammaglobin valamely módon rokonságban van a hEMBP-vel.

Azonban, míg mind a prosztatein és a hEMBP kimutatható a prosztata mirigyben, a mammaglobin mRNS teljes mértékben hiányzik ebből a szövetből. Így tehát a mammaglobin nem ugyanaz a fehérje és nem is alegysége a hEMBP-nek és továbbá a hEMBP szekvenciája nem kerül meghatározásra, így tehát nem ismert, hogy van-e valójában bármilyen hasonlóság a mammaglobin és a hEMBP valamely fragmense vagy alegysége között.

Bár újabban megjelent közleményekben leírták, hogy az SV40 T-antigénhez fuzionált rPSC3-promóter mind prosztata és emlő karcinómát létrehoz transzgénikus egerekben [Maroulakou és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 11236 (1994); Sandmoller és mtsai.: Oncogene 9 2805 (1994), amely referenciák teljes egészükben a kitanítás részének tekintendők]; ennek a fehérjének a valódi biológia szerepe ismeretlen. Továbbá a patkány prosztata eredetű szteroid kötő fehérje és a humán EMBP hipotetikus rokonságának ellenére nem izoláltak semmiféle olyan humán polipeptidet vagy humán gént, amely megfelel az rPSC3-nak. Így a mammaglobin és a mammaglobint kódoló cDNS mindmostanáig ismeretlen új szekvenciákat képvisel.

Kézi összehasonlítási eljárások segítségével, olyan szekvenciákat vizsgálva, amelyek kevésbé szignifikáns BLAST értékeket mutattak mind a mammaglobin és az rPSC3 szekvenciákkal, további homológiákat azonosítottunk a humán klara sejt 10 kDa fehérjével (hCC10, 8. azonosítási szám szerinti szekvencia, 3. ábra), [Peri és mtsai.: J. Clin. Invest. 92 2099 (1993), amely referencia teljes egészében a kitanítás

részének tekintendő]; valamint továbbá nyúl és egér uteroglobulin fehérjékkel [Miele és mtsai.: Endocrine Rev. 8 474 (1987); Cato és Beato: Anticancer Res. 5 65 (1985); Miele és mtsai.: J. Endocrinol. Invest. 17 679 (1994), amely referenciák teljes egészükben a kitanítás részének tekintendők]. Ezek a homológiák - a fajtól függően - 26% vagy a konzervatív szubsztitúciókat figyelembe véve 40% azonosságot mutattak. Közelebbről, számos aminosav tökéletesen konzervált volt az összes fehérje között, beleértve a Cys-3 és Cys-69 aminosavakat, amelyekről ismert, hogy szerepet játszanak diszulfid híd kialakításában az uteroglobulin alegységek között (lásd alább). Ezek a homológiák arra utalnak, hogy a mammaglobin új tagja egy kis fehérje családnak, amelyeket epitél sejtek szekretálnak [Miele és mtsai.: (1994), lásd fentebb].

A hCC10 gén a humán homológja a nyúl és egér uteroglobulin géneknek [Peri és mtsai.: J. Clin. Invest. 92 2099 (1993), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő]. Az uteroglobint eredetileg mint szekretálódó fehérjét jellemezték nyúl méhben, és azóta már megtalálták további epitél szervekben is, beleértve a tüdőt, emlőt és prosztatát. Ellentétben a patkány prosztatáinál az uteroglobin egy homodimer fehérje, amelyet két diszulfid kötés kapcsol össze a Cys-2 és Cys-69 konzervált aminosavaknál [Miele és mtsai.: (1994), lásd fentebb].

A mammaglobin expressziója az emlőmirigyre korlátozódik. Ez ellentétben van azzal a megfigyeléssel, hogy az rPSC3 expresszálódik patkány ventrális prosztatában [Parker



és mtsai.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 438 115 (1984)], és ellen-
tétben van a hCC10/uteroglobín expressziójával számos szö-
vetben, beleértve a tüdőt, méhet, prosztatát és emlőt
[Miele és mtsai.: (1987), lásd fentebb; Cato és Beato:
(1985), lásd fentebb; Miele és mtsai.: (1994), lásd fen-
tebb]. A mammaglobin és az ezen fehérjék között fennálló
szekvencia homológia miatt meghatároztuk a szövet specifi-
kus expresszió mintázatát.

Az 500 bp nagyságú mammaglobin mRNS könnyen kimutatható
volt 2410-tumor mintában (ez az a szövet, amelyből az ere-
deti szekvencia jelölő izolálásra került) és sokkal kisebb
mértékben normál humán emlőszövetben (4A. ábra). Mammaglo-
bin mRNS nem volt kimutatható a halhatatlanná tett B5-589
emlő epitél sejtvonalban. Mammaglobin expressziója hasonló-
képpen nem volt kimutatható emberi méhben és tüdőben, amely
az uteroglobín expresszió két ismert helye.

RT/PCR segítségével végzett amplifikálás mammaglobin
mRNS-t mutatott ki mind a 2410-tumorban és normál emlőszö-
vetben, de nem mutatta ki 15 további megvizsgált szövetben,
beleértve olyan szöveteket, amelyek normál esetben expresz-
szálnak rPSC3-t és uteroglobint (tüdő, méh, prosztata),
hormonálisan reagáló és szteroid-termelő szövetekben (pete-
fészek, here, méhlepény) és más szekretáló epitél szervek-
ben (végbél) (4B. ábra). Ezért tehát a mammaglobin mRNS
expressziója viszonylag specifikus az emlőszövetre.

A leírásra kerülő vizsgálatok alapján a mammaglobin vi-
szonylag emlő specifikus fehérje. Két másik génről ismert,
hogy túlexpresszióra kerül emlő karcinómában, ez az erb-B



és a ciklin-D [Jardines és mtsai.: Pathobiology 61 268 (1994); Keyomars és Pardee: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 1112 (1993), amely referenciák teljes egészükben a kitanítás részének tekintendők]. Ellentétben az erb-B vagy a ciklin-D túlexpressziójával, a mammaglobin túlexpressziója az emlő epitél sejt specifikusabb megváltozását jelezheti, mint egy általános, megnövekedett növekedési potenciált vagy mitotikus sebességet. Mint olyan, a mammaglobin gén szabályozásának szétesése több specifikus betekintést tehet lehetővé egy tumor terápiás sebezhetőségébe vagy klinikai viselkedésébe.

Mammaglobin expresszió nem volt kimutatható normál nyirokcsomókban vagy perifériás limfocitákban egyetlen lépéses RT/PCR vizsgálati eljárás által biztosított érzékenységi szint mellett. Ez arra utal, hogy a mammaglobin transzkriptumok analízise perifériás nyirokcsomókban alkalmas lehet ismeretlen mellrák metasztázisok kimutatására, ahogyan ezt más epitél specifikus gének esetében korábban már javasolták [Schoenfeld és mtsai.: Cancer Res. 54 2986, amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő].

Annak bizonyítására, hogy a mammaglobin cDNS transzlációba vihető fehérjét kódol, a cDNS klónt *in vitro* transzlációs vizsgálati eljárásban alkalmaztuk. Az 5. ábra mutatja be a fehérje terméket, amit a mammaglobin cDNS-sel "programozott" nyúl retikulocita lizátumból nyertünk. Egy körülbelül 6 kDa nagyságú fehérje keletkezett a mammaglobin cDNS alkalmazásával. A kapott molekulatömeg kisebb, mint a nyílt leolvasási fázis fogalmi alapon történő lefordításá-

ból előre jelezhető molekulatömeg, de ez általában megfigyelhető nyúl és humán uteroglobin transzlációs termékek esetében.

Bár észleltünk mammaglobin RNS túlexpressziót egy tumor minta esetében (azaz 2410-tumor), nem volt egyértelmű, hogy milyen gyakorisággal észlelhető ez a túlexpresszió más emlő karcinómáknál. Ezért tehát Northern-blott hibridizáció segítségével megvizsgáltuk tizenöt, különböző hisztológiai típusú I. fázisú emlő karcinóma csoportját a mammaglobin cDNS-próba segítségével. Az expresszióban fennálló potenciális változékonyság miatt - amely környezeti hatásoknak tudható be, mint például a páciens hormonális állapota - igyekeztünk a tumor mintákat közvetlenül összehasonlítani, a páciensnek megfelelő normál emlő szövet mintákkal, bár ez sok esetben nem volt lehetséges. Ahogyan ezt a 6. ábrán bemutatjuk, az 500 bp nagyságú mammaglobin mRNS-t ismét ki tudtuk mutatni normál emlő szövetben és 2410-tumorban. Mammaglobint úgyszintén ki tudtunk mutatni három további tumorban, amelyek közül kettő kismértékű expressziót mutatott vagy egyáltalán nem mutatott expressziót a páciensnek megfelelő normál szövetben (B015 és B022). Összességében a 15 megvizsgált tumor közül 4 (27%) esetében találtunk mammaglobin mRNS túlexpressziót. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a mammaglobin túlexpressziója nem kizárólagos egyetlen tumor mintára és valószínűleg viszonylag gyakori a primer emlőtumorok között. Továbbá az a tény, hogy az összes vizsgált tumor I. fázisú volt azt jelzi, hogy a szabályozásnak ez a szétesése viszonylag korán jelenik meg az



emlő neoplázia progressziója során.

Mivel a feltalálók véleménye szerint a mammaglobin szekretált fehérje, jelenléte feltételezhetően kimutatható olyan páciensekből származó szérumban, akiknek tumorja túl-expresszálja ezt a génterméket. Így tehát a mammaglobin a mellrákos páciensek kezelésében klinikai szempontból feltételezhetően olyan mértékben hasznos, mint a prosztata specifikus antigén (PSA) és más szilárd tumor markerek ["Tumor Markers in Diagnostic Pathology" Clin. Lab. Med. 10 1 (1990), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő].

Meghatároztuk a mammaglobin, mint tumor marker előfordulását mellrák tumorok általános populációjában a mammaglobin expressziójának vizsgálatával számos primer emlő karcinóma esetében. Bár a tanulmány során megvizsgált minták száma kicsi volt, az értékelte tumorok 27%-a túlexpresszálta a mammaglobin mRNS-t. Ez a százalékos arány összehasonlítható más genetikai elváltozások előfordulásával, mint például erb-B amplifikálás és p53 mutáció [Slamon és mtsai.: Science 244 707 (1989); Thor és mtsai.: J. Nat'l. Cancer Inst. 84 845 (1992), amely referenciák teljes egészében a kitanítás részének tekintendők]. Továbbá, mert analízisünket I. fázisú tumorokra korlátoztuk, a mammaglobin túlexpressziója ténylegesen gyakoribb előfordulású mint bármely más genetikai elváltozás, amelyről a tumorok ezen alcsoportjában beszámoltak [Allerd és mtsai.: J. Nat'l. Cancer Inst. 85 200 (1993), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő].

A mammaglobin azonosítása - mint mellrák marker - képezi az alapját a találmány egy másik aspektusának, amely eljárásokat biztosít mellrák jelenlétének kimutatására a páciensben.

A "kimutatás" kifejezés alatt - a leírás során az emlő neopláziás betegség kimutatásával összefüggésben - összefoglaló kifejezést értünk, amely magába foglalja mellrák jelenlétének kimutatását a páciensben, mellrák megkülönböztetését más betegségektől, a prognózis becslését a betegség valószínűsíthető kimenetelét és a gyógyulás lehetőségét illetően, a betegállapot követését vagy a betegség kiújulását illetőleg, az előnyös gyógykezelési eljárás meghatározását a páciens számára és az antitumor gyógykezelés célirányos alkalmazását.

A mellrák kimutatásának eljárása magába foglalja polinukleotid hibridizálását az emlő neoplázia sejtekből származó mRNS-sel. A polinukleotid az 1. azonosítási szám szerinti szekvenciát vagy az 1. azonosítási szám szerinti szekvencia származékát tartalmazza. Egy nukleotid szekvencia származéka alatt azt értjük, hogy a származék nukleotid szekvencia lényegében azonos azzal a szekvenciával, amelyikből származik, olyan értelemben, hogy a származék nukleotid szekvencia kellő mértékű szekvencia komplementaritást mutat azzal a szekvenciával, amelyikből származik, és így képes emlő neoplázia sejtekből származó mRNS-sel hibridizálni azonos sztringensségű körülmények között, mint ahogy az eredeti szekvencia (amelyikből származtattuk) hibridizál az emlő neoplázia sejtekből származó mRNS-sel. A



származtatott nukleotid szekvencia nem szükségszerűen származik fizikailag az eredeti nukleotid szekvenciából, hanem bármely módon létrehozható, magába foglalva például kémiai szintézist vagy DNS replikációt vagy reverz transzkripciót vagy transzkripciót.

Annak érdekében, hogy mellrák kimutatására szolgáló kimutatási rendszerben mammaglobint kódoló mRNS jelenlétét mutassuk ki, a páciensből mintát nyerünk. A minta lehet szöveti biopszia minta, vagy vér-, plazma-, szérum-, vagy más hasonló minta. A mintát kezelhetjük a bennük található nukleinsavak kinyerése érdekében. A mintából eredményül kapott nukleinsavat gél elektroforézisnek vetjük alá vagy más, méret alapján történő elválasztási módszert alkalmazunk.

A kimutatás magába foglalja a nukleinsavak - közelebb-ről meghatározva a mintából származó mRNS és egy próbaként szolgáló DNS szekvencia - érintkeztetését, hogy hibrid duplexeket hozzunk létre. A "próba" kifejezés alatt olyan struktúrát értünk, amely egy megcélzott szekvenciával hibrid struktúrát kialakítani képes polinukleotidot tartalmaz, a próba szekvenciája és a megcélzott régió szekvenciájának komplementer jellege következtében.

A kapott duplex kimutatását rendszerint jelölt próbák segítségével végezzük. Alternatív módon eljárva a próba lehet jelöletlen is, de kimutatható jelölt ligandhoz történő specifikus kötődése révén, közvetlenül vagy közvetetten. Megfelelő jelölők és a próbák és ligandok jelölésére szolgáló eljárások a technika állása szerint ismertnek tételez-

hetők fel, és magukba foglalnak például radioaktív jelölőket, amelyek önmagukban ismert módon bevihetők (mint például nick transzláció vagy kináz segítségével végzett bevitel), magukba foglalnak biotint, fluoreszcens csoportokat, kemilumineszcens csoportokat (mint például dioxetánok, közelebbről triggerált dioxetánok), enzimeket, antitesteket és más hasonlókat.

Amikor a mammaglobint kódoló cDNS-t vagy annak egy származékát próbaként alkalmazzuk, magas sztringensségű körülmények alkalmazhatók annak érdekében, hogy megakadályozzuk a téves pozitív kapcsolódásokat. Amikor mammaglobinból levezetett szekvenciákat alkalmazunk, kevésbé sztringens körülményeket használhatunk. A hibridizáció sztringensségét számos tényező határozza meg a hibridizáció során és a mosási folyamat során, beleértve a hőmérsékletet, ionerősséget, a lépés időtartamát és a formamid koncentrációját. Ezek a tényezők leírásra kerültek például a következő publikációban: Sambrook és mtsai.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. kiadás, (1989).

Annak érdekében, hogy megnöveljük a mammaglobin mRNS kimutatásának érzékenységét a mintában, a reverz transzkripció - polimeráz láncreakció (RT/PCR) eljárás alkalmazható a mammaglobint kódoló mRNS-ből transzkripcióval nyert cDNS amplifikálására. Az RT/PCR eljárás a technika állása szerint ismertnek tételezhető fel (például: Watson és Fleming, lásd fentebb).

Az RT/PCR eljárás az alábbiak szerint hajtható végre. Összes sejt RNS-t izolálunk például a standard guanidínium-

izotiocianát eljárás segítségével és a teljes RNS-t reverz transzkripcióba visszük. A reverz transzkripciós eljárás magába foglalja DNS szintézisét RNS templáton, reverz transzkriptáz enzim és 3'-végi primer alkalmazásával. Tipikus esetben a primer oligo(dT) szekvenciát tartalmaz. Az így előállított cDNS-t ezután a PCR eljárás és mammaglobin specifikus primerek alkalmazásával amplifikáljuk [Belyavsky és mtsai.: Nucl. Acid Res. 17 2919 (1989); Krug és Berger: Methods in Enzymology, Academic Press, N.Y., 152 316 (1987), amely referenciák teljes egészükben a kitanítás részének tekintendők].

A polimeráz láncreakciós eljárást két olyan oligonukleotid primer segítségével hajtjuk végre, amelyek komplementerek az amplifikálásra kerülő DNS szegmens két határoló régiójával. Az 5'-irányban elhelyezkedő és a 3'-irányban elhelyezkedő primerek tipikusan 20-30 bázispár hosszúságúak és a határoló régiókkal hibridizálnak a nukleotid szekven-
cia replikációjához. A primereket úgy választjuk ki, hogy lényegében komplementerek legyenek az amplifikálásra kerülő cDNS szállal. Ezért tehát a primerek nem szükségszerűen tükrözik a templát pontos szekvenciáját, de kellő mértékben komplementerek, hogy szelektív módon hibridizáljanak az amplifikálásra kerülő szállal.

A primerekből történő polimerizációt egy DNS-polimeráz katalizálja deoxinukleotid-trifoszfátok vagy nukleotid analógok jelenlétében, hogy ezzel kettős-szálú DNS-molekulákat állítsunk elő. A kettős-szálakat ezt követően szétválasztjuk bármelyik denaturáló módszer alkalmazásával, beleértve

fizikai, kémiai vagy enzimes módszereket. Általános esetben a fizikai denaturálás módszerét alkalmazzuk, amely magába foglalja a nukleinsav felmelegítését, tipikus esetben körülbelül 80 °C és 105 °C közötti hőmérsékletre, körülbelül 1 perctől 10 percig tartó időtartamokra. Az eljárást kívánt számú ciklusban megismételjük.

Az amplifikálást követően a PCR-terméket ezután etídi-um-bromid festéssel kimutatjuk [Sambrook és mtsai.: (1989), lásd fentebb].

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint a mammaglobin cDNS-szekvenciát vagy annak származékát alkalmazzuk a mammaglobin gén bármely megváltozásának jellemzésére (mint például gén átrendeződés, gén amplifikálás vagy gén deléció) mellrákban szenvedő betegből származó mintán. Ez eljárást biztosít, ahol olyan páciensből származó minták vagy anyagok is vizsgálhatók a gén struktúrában fellépő változásokra, amelyek nem tartalmazznak érintetlen mRNS-t.

Ennek az eljárásnak egy alkalmazása során a mammaglobin cDNS-szekvenciát vagy annak származékát hibridizáljuk olyan páciensből származó genomi DNS-hez, amelyet a páciens tumorjából, normál szövetéből vagy limfocitákból izoláltunk és egy vagy több restrikciós endonukleázzal emésztettünk. A Southern-blott protokoll alkalmazásával - amely a technika állása szerint jól ismertnek tekinthető fel - ezen a vizsgálati eljárás segítségével meghatározzuk hogy egy páciens vagy egy páciens emlőtumora rendelkezik-e olyan mammaglobin génnel, amely delécióra került, átrendeződött vagy amplifikálódott. Ezeknek a változásoknak a kimutatása ezután fon-

tos információt biztosíthat, ami hasznos a prognózis előrejelzése és a páciens kezelése szempontjából.

Ezen eljárás egy második alkalmazása során a mammaglobin cDNS-szekvencia vagy annak származéka alapján készült egy vagy több oligonukleotid primer pár alkalmazható a polimeráz láncreakcióban, hogy egy páciensből nyert mintából a mammaglobin gén szegmenseit amplifikáljuk. A kapott PCR termékek analízise jelzi, hogy vajon a mammaglobin gén egy adott szegmense delécióra került vagy átrendeződött. Az ilyen információ jól alkalmazható prognózisra és a páciens kezelésében.

A mellrák kimutatásának egy másik eljárása szerint a mammaglobin polipeptid prekursorának és/vagy szekretált formáinak a jelenlétét mutatjuk ki egy páciensből nyert mintában. A technika állása szerint ismert bármely, fehérjék kimutatására alkalmas eljárás alkalmazható. Nem korlátozó értelemben véve az ilyen módszerek közé tartoznak a következők: immundiffúzió, immun-elektroforézis, immunkémiai módszerek, megkötő-ligand vizsgálati eljárások, immunhisztokémiai eljárások, agglutináció és komplement vizsgálati eljárások. A fentiekre például lásd: Basic and Clinical Immunology, szerk.: Sites and Terr, Appleton & Lange, Norwalk, Conn. 217-262. old., (1991), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő. Előnyösen alkalmazhatók a megkötő-ligand immunológiai vizsgálati eljárások, beleértve antitestek reagáltatását mammaglobin epitóppal vagy epitópokkal és kompetitív módon leszorítva egy jelölt mammaglobin polipeptidet vagy annak

származékát.

A leírás során a "mammaglobin polipeptid" kifejezés egyaránt magába foglal természetes körülmények között előforduló mammaglobint, beleértve nem-glikozilált és glikozilált szekretált formákat és a glikozilált szekretált formát, ezeknek származékait és fragmenseit. Természetes körülmények között előforduló alatt olyan polipeptidet értünk, amely természetben megtalálható forrásból izolálható, azaz normál és/vagy beteg szervezetből és amely nem lett ember által szándékosan módosítva.

Egy mammaglobin származék alatt olyan polipeptidet értünk, amely legalább 10 aminosavból álló szegmenst tartalmaz, amely szegmens jelentős mértékű azonosságot mutat természetes körülmények között előforduló mammaglobin egy részével. A jelentős mértékű azonosságot mutató szegmens előnyösen legalább 20 aminosavat, előnyösebben legalább körülbelül 50 aminosavat és legelőnyösebben legalább körülbelül 75 aminosavat tartalmaz. Két polipeptid esetében jelentős mértékű azonosságról akkor beszélünk, amikor szekvencia illesztő programok segítségével - mint például BLAST - létrehozott optimális illeszkedés esetén legalább 80 százalék szekvencia azonosság található, előnyösen legalább 95% szekvencia azonosság található, előnyösebben legalább 95% szekvencia azonosság található és legelőnyösebben legalább 99% szekvencia azonosság található. Előnyösen azon aminosav pozíciókban, amelyek nem azonos aminosavat tartalmaznak, konzervatív aminosav szubsztitúció okozza az eltérést.

A konzervatív aminosav szubsztitúciók kifejezés a hasonló oldallánccal rendelkező aminosavak kölcsönös felcserélhetőségére vonatkozik. Így például alifás oldallánccal rendelkező aminosavak csoportját alkotják a következők: glicin, alanin, valin, leucin és izoleucin; alifás-hidroxi- oldallánccal rendelkező aminosavak csoportját alkotják a következők: szerin és treonin; amidot tartalmazó oldallánccal rendelkező aminosavak csoportját alkotják a következők: aszparagin és glutamin; aromás oldallánccal rendelkező aminosavak csoportját alkotják a következők: fenilalanin, tirozin és triptofán; bázikus oldallánccal rendelkező aminosavak csoportját alkotják a következők: lizin, arginin és hisztidin; és ként tartalmazó oldallánccal rendelkező aminosavak csoportját alkotják a következők: cisztein és metionin. Előnyös konzervatív aminosav szubsztitúciós csoportok a következők: valin-leucin-izoleucin, fenilalanin-tirozin, lizin-arginin, alanin-valin és az aszparagin-glutamin.

Egy mammaglobin származék polipeptid előnyösen kereszt-reagál egy mammaglobin elleni antitesttel - akár monoklonális vagy poliklonális - amely specifikus természetes körülmények között előforduló mammaglobinra vagy annak fragmenseire.

A leírás során a "fragmens" és "peptid" kifejezések alatt olyan mammaglobin polipeptidet értünk, amelynek aminosav szekvenciája azonos a teljes hosszúságú mammaglobin cDNS-ből (például 1. azonosítási szám szerinti szekvencia) vagy annak származékából levezethető aminosav szekvenciá-

val, de amino-terminális és/vagy karboxi-terminális deléció történt. Tipikus esetben a mammaglobin fragmensek vagy peptidek legalább 3 aminosav hosszúak. Előnyösen egy mammaglobin fragmens vagy peptid legalább 6 aminosav hosszú, előnyösebben körülbelül 12 aminosav hosszú, még előnyösebben körülbelül 25 aminosav hosszú, és legelőnyösebben 50 aminosav hosszú vagy annál nagyobb.

Számos kompetitív és nem-kompetitív fehérje kötési immunológiai vizsgálati eljárás jól ismert a technika állása szerint. Az ilyen vizsgálati eljárásokban alkalmazott antitestek lehetnek jelölés nélküliek - mint például az agglutinációs próbákban alkalmazottak - vagy lehetnek jelöltek a vizsgálati eljárások széles választékának megfelelően. Az alkalmazható jelölések magukba foglalnak radionuklidokat, enzimeket, fluoreszkáló anyagokat, kemilumineszcenciát mutató anyagokat, enzim szubsztrátokat vagy ko-faktorokat, enzim inhibitorokat, részecskéket, színezékeket és más hasonlókat radioimmunológiai vizsgálati eljárásban (RIA), enzim immunológiai vizsgálati eljárásban (mint például enzimkapcsolt immunszorbens vizsgálatban, ELISA), fluoreszcens immunológiai vizsgálati eljárásban és más hasonlóknál alkalmazva.

B-sejt epitópot tartalmazó mammaglobin polipeptid elleni poliklonális vagy monoklonális antitest állítható elő immunológiai vizsgálati eljárásban történő alkalmazásra a technika állása szerint ismert számos eljárás bármelyikével. A leírás során a "B-sejt epitóp" kifejezés alatt mammaglobin polipeptid antigén determinánsát értjük. Egy B-

sejt epitóp tartalmazhat 3 aminosavat olyan térbeli elrendezésben, amely az epitópra egyedi. Általánosságban egy B-sejt epitóp legalább 5 ilyen aminosavat tartalmaz. Az aminosavak térbeli elrendeződésének meghatározásra alkalmas eljárások a technika állása szerint ismertek és például magukba foglalják a következőket: röntgen krisztallográfia és kétdimenziós magmágneses rezonancia.

Egy fehérje elleni antitestek előállítására szolgáló megközelítés során a fehérje egészét vagy részét tartalmazó aminosav szekvenciát választunk ki és elkészítjük oly módon, hogy kémiai úton a szekvenciát megszintetizáljuk és a szekvenciát megfelelő állatba, általában nyúlba vagy egérbe injektáljuk.

Egy mammaglobin polipeptid előállítására szolgáló eljárások nem korlátozó értelemben magukba foglalnak kémiai szintézist, rekombináns DNS technikákat vagy biológia mintákból történő izolálást. Epitópot tartalmazó peptid kémiai szintézisét megvalósíthatjuk például a szilárd fázisú peptidszintézis klasszikus Merrifield módszerével [Merrifield: J. Am. Chem. Soc. 85 2149 (1963), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő], vagy az FMOC stratégiával egy Rapid Automated Multiple Peptide Synthesis rendszer segítségével (DuPont Company, Wilmington, DE) [Caprino és Han: J. Org. Chem. 37 3404 (1972), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő].

Poliklonális antitestek előállíthatók oly módon, hogy nyulakat immunizálunk antigén beinjektálásával a térdhajlathi nyirokcsomókba, amelyet rákövetkező gyorsító injekciók-

kal egészítünk ki kéthetes időközökben az antigén intra-peritoneális bejuttatásával. Az állatokból vért veszünk és a szérumot tisztított mammaglobin fehérjével szemben vizsgáljuk, általában ELISA segítségével.

Monoklonális antitestek előállíthatók Milstein és Kohler eljárása szerint immunizált egerekből származó lép-sejteket fuzionálva folyamatosan replikálódó tumor sejtekkel, mint például mielóma vagy limfóma sejtek [Milstein és Kohler: Nature 256 495 (1975); Gutfre és Milstein: Methods in Enzimology: Immunochemical Techniques, szerk.: Langone és Banatis, Academic Press, 73 1-46. old., (1981), amely referenciák teljes egészükben a kitanítás részének tekintendők]. Az így kialakított hibridóma sejteket ezt követően a korlátozó hígítás módszerével klónozzuk és a felülúszókat ELISA vagy RIA segítségével antitest termelésre vizsgáljuk.

Az így előállított mammaglobin elleni poliklonális vagy monoklonális antitestek alkalmazhatók mammaglobin prekursor és szekretált formáinak izolálására és tisztítására mammaglobint expresszáló sejtekből. Így például - ahogy ezt alább bemutatjuk - a mammaglobin cDNS-ből levezethető 16 C-terminális aminosav (Glu-Val-Phe-Met-Gln-Leu-Ile-Tyr-Asp-Ser-Ser-Leu-Cys-Asp-Leu-Phe; 14. azonosítási szám szerinti szekvencia) ellen termeltetett poliklonális antitest kötődik a mammaglobin prekursor és szekretált formáihoz éppúgy, mint egy *in vitro* transzlációs rendszerben szintetizált mammaglobinhoz. Mammaglobin izolálása egy mammaglobin elleni antitest alkalmazásával megvalósítható a technika állása szerint jól ismert eljárások segítségével, mint például af-

finitás kromatográfiával.

Az antitesteknek az az egyedülálló képessége, hogy egy tumor sejt által expresszált megcélzott antigént felismerjen és ahhoz specifikusan kötődjön, lehetőséget biztosít a rák kezelésére [összefoglalását lásd: LoBuglio és Saleh, Am. J. Med. Sci. 304 214 (1992); Bagshawe: Adv. Pharmacol. 24 99 (1993), amely referenciák teljes egészükben a kitanítás részének tekintendők]. Így egy másik aspektus szerint a találmány tárgyát képezi egy eljárás mellrák kialakulásának megelőzésére és mellrák kezelésére állatban, amelynek során mammaglobin - felfedezésünk szerint ez a fehérje túlexpresszióra kerül mellrák sejtekben - elleni antitesteket alkalmazunk.

Mammaglobin elleni specifikus antitestek - akár poliklonális vagy monoklonális - a technika állása szerint ismert bármely módszer szerint előállíthatóak. Így például egér vagy humán eredetű monoklonális antitestek előállíthatók hibridóma eljárás segítségével. Alternatív módon mammaglobin, vagy annak immunológiailag aktív származéka vagy fragmense, vagy egy anti-idiotípusos antitest vagy annak fragmense juttatható be állatba, hogy antitestek B-sejtek segítségével történő termelését hozza létre, amely antitestek képesek felismerni a mammaglobint termelő sejteket.

Az így termelt antitesteket vagy azok fragmenseit egy vagy több onkolitikus anyaggal jelöljük, mint például radionuklidok, toxinok vagy citotoxikus hatóanyagok és a feltételezhetően mellrákban szenvedő páciensnek beadjuk. A

jelölt antitest kötődése a mellrák sejt által túlexpresszált mammaglobinhoz a rákos sejt pusztulását okozza.

A technika állása szerint ismert számos onkolitikus anyag bármelyike alkalmazható ilyen jelölt antitestek előállítására. Így például immunotoxinok állíthatók elő oly módon, hogy növényi és bakteriális eredetű toxinokat kapcsolunk antitestekhez. Ilyen toxinok közé tartoznak például az alább következők: ricin, diftéria toxin és *Pseudomonas* exotoxin-A. Hasonlóképpen hatóanyag-antitest konjugátumok állíthatók elő, amelyek esetében kemoterápiás ágenseket kapcsolunk az antitestekhez. Az alkalmazható kemoterápiás ágensek közé tartoznak például az alábbiak: tomoxifen, doxorubicin, metotrexát, klórambucil, Vinca alkaloidok és mitomicin. Továbbá radio-immunkonjugátumok állíthatók elő, amelyekben egy radionuklidot stabil módon hozzákapcsolunk az antitesthez. A radio-immunkonjugátumok előállításához alkalmazható radionuklidok közé tartoznak például az alábbiak: β -sugárzók, mint például ^{131}I , ^{188}Re , ^{186}Re , ^{67}Cu , ^{90}Y és ^{47}Sc ; α -sugárzók, mint például ^{211}At , ^{212}Bi és ^{212}Pb ; auger elektron kibocsátók, mint például ^{125}I és ^{77}Br , valamint hasítható nuklidok, mint például ^{10}B .

Az a felfedezés, hogy az emlőtumorok jelentős százaléka expresszálni mammaglobin fehérjét, képezi az alapját a találmány egyik aspektusának, amely magába foglalja mammaglobin specifikus B-sejt és/vagy T-sejt limfociták (T_c) aktiválását mammaglobin-antigénekkal. Ennek megfelelően a találmány tárgyát képezik mammaglobin B-sejt antigének és T_c -sejt antigének; olyan vakcinák, amelyek legalább egy

B-sejt mammaglobin-antigént és/vagy legalább egy T_c mammaglobin-antigént tartalmaznak antigén- és/vagy sejt-közvetített immunválaszok indukálására mammaglobint expresszáló tumorok ellen és továbbá a találmány tárgyát képezik eljárások mammaglobint expresszáló tumor okozta mellrákban szenvedő páciens kezelésére. Egy, a találmány szerinti eljárás során a páciensnek aktivált mammaglobin specifikus limfocitákat adunk be. Egy másik eljárás szerint a páciensnek mammaglobin specifikus vakcinát adunk be.

A leírás során a "mammaglobin-antigén" kifejezés alatt olyan természetes körülmények között előforduló mammaglobin polipeptideket, azok származékait és fragmenseit értjük, amely a mammaglobin specifikus B-sejtek vagy T_c-sejtek által felismert B-sejt vagy T_c-sejt epitópot tartalmaznak.

Egy mammaglobin B-sejt antigén mammaglobin specifikus B-sejt epitópot és T_H-sejt epitópot tartalmaz. A leírás során a "B-sejt epitóp" kifejezés bármely olyan antigénre, hapténre, epitópra vagy antigén determinánsra vonatkozik, amelyet anti-mammaglobin immunglobulin receptorok a B-sejtek felületén felismerni képesek és képes az antitestek termelését kiváltani T_H-sejtektől kapott megfelelő segítséggel, amikor egy állatnak beadjuk. A B-sejt epitóp legalább 4 aminosavból álló aminosav szekvenciát tartalmaz. Előnyösen a B-sejt epitóp legalább 6 és 25 aminosav hosszúság közé esik, és előnyösebben körülbelül 15 és 22 aminosav hosszúság közé esik. A B-sejt epitópon belül található aminosav szekvencia azonos lehet vagy lényegében azonos lehet egy természetes körülmények között előforduló mammaglobin



fragmensében található folyamatosan illeszkedő aminosav szekvenciával. Alternatív módon egy B-sejt epitópon belül található aminosav szekvencia azonos vagy lényegében azonos olyan nem folyamatosan illeszkedő aminosav szekvenciával, amely mammaglobin illeszkedő topográfiai determinánsát képviseli.

A leírás során a " T_H -sejt epitóp" kifejezés alatt bármely olyan antigén determinánst értünk, amelyet MHC II. osztályba tartozó molekulákkal történő kapcsolódáson keresztül T-helper sejtek felismerni képesek. A T-helper sejtek aktiválása nyugvó mammaglobin specifikus B-sejtek differenciálódását indukálja magasabb affinitású IgG-szekretáló sejtekké, azaz szekunder antitest választ indukál. A technika állása szerint a B- és T_H -sejt determinánsokat tartalmazó immunogén peptidek alkalmazása magasabb titerű, specifikus antitest termelő B-sejtek előállítására - T-sejtek segítségével keresztül - ismertnek tételezhető fel [lásd például a következőket: Cheronis és mtsai.: 5,573,916 lajstromszámú US szabadalom; Denton és mtsai.: Cancer Letters 70 143 (1993); Borrás-Cuesta és mtsai.: Eur. J. Immunol. 17 1213 (1987) valamint Good és mtsai.: Science 235 1059 (1987), amely referenciák teljes egészükben a ki-tanítás részének tekintendők]. A T_H -sejt epitóp tartalmazhat mammaglobinból vagy heterológ fehérjéből származó aminosav szekvenciát. Így például Denton és munkatársai írták le antitest válaszok indukálását mucinok ellen - amelyek szekretáló epitéliumban expresszált komplex glikoproteinek, és emlő, valamint más karcinómákhoz társulnak - olyan ege-

rekben, amelyeket az influenza hemagglutinin A/X-31 111-120. szekvenciájához - egy ismert helper T-sejt determináns - kapcsolt, a MUC-1 mucin belsejéből származó B-sejt determináns régiót tartalmazó szintetikus peptiddel immunizáltunk. A T_H -sejt epitóp körülbelül 6 és körülbelül 20 aminosav közötti aminosav szekvenciát tartalmaz, előnyösen körülbelül 8 és 18 aminosav közötti szekvenciát tartalmaz és még előnyösebben 9 és 15 aminosav közötti szekvenciát tartalmaz.

Egy mammaglobin T_c -sejt antigén T_c -sejt epitópot és MHC I. osztályba tartozó agretópot tartalmaz. A leírás során a "T_c-sejt epitóp" kifejezés alatt bármely olyan antigént, epitópot vagy antigén determinánst értünk, amelyet mammaglobin specifikus T_c -sejtek felismerni képesek, amikor MHC I. osztályba tartozó molekula felé prezentáljuk egy antigén prezentáló sejt felületén. A leírás során az "MHC I. osztályba tartozó agretóp" kifejezés alatt bármely olyan aminosav szekvenciát értünk, amelyet MHC I. osztályba tartozó molekula felismerni képes és amely lehetővé teszi a mammaglobin-antigén prezentálását mammaglobin specifikus T_c -sejt felé az MHC I. osztályba tartozó molekula segítségével antigén prezentáló sejten (Antigen Presenting Cell, APC). A T_c -sejt epitóp és az MHC I. osztályba tartozó agretóp egy körülbelül 6 és körülbelül 11 aminosav közötti aminosav szekvencián belül található meg, amely szekvencia azonos vagy lényegében azonos egy természetes körülmények között előforduló mammaglobin fragmensének aminosav szekvenciájával. Előnyösen a szekvencia hossza 8 vagy 9 aminosav.

A technika állása szerint ismertek egy fehérje antigén B- és T_c-sejt epitópjainak azonosítására szolgáló eljárások. Így például az izolált mammaglobin specifikus B-sejtek vagy a mammaglobin specifikus T_c-sejtek azon képessége, hogy választ mutassanak szekretált mammaglobint átfogó, egymást átfedő szintetikus peptidekkel szemben, meghatározható standard immunbiológiai eljárások segítségével. Az antigénként azonosított peptidek ezt követően egyszerre egy vagy néhány aminosavat megváltoztatva módosíthatók, hogy optimalizáljuk stimuláló képességüket mammaglobin specifikus B- vagy T-sejtekkel szemben.

B-sejt epitópok feltérképezhetők oly módon is, hogy kereskedelmi forgalomban beszerezhető epitóp térképező vegyszerkészleteket alkalmazunk, ami magába foglalja C-terminálisukon polietilén "multipin" hordozókhoz kötött, véletlenszerűen kiválasztott peptidek szkrinelését (mint például Cambridge Research Biochemicals).

Alternatív módon az előre jelzett mammaglobin aminosav szekvencia megvizsgálható olyan szekvenciákra, amelyek az MHC I. osztályba vagy az MHC II. osztályba tartozó molekulák ismert kötő részegységeinek felelnek meg [lásd például: Hill és mtsai.: Nature 360 434 (1992), Pamer és mtsai.: Nature 360 852 (1992), Hammer és mtsai.: J. Exp. Med. 176 1007 (1992), valamint Falk és mtsai.: Nature 351 290 (1991), amely referenciák teljes egészükben a kitanítás részének tekintendők]. Így például emlőtumor specifikus CTL-ek által felismerhető antigén sajátosságú peptidek azonosíthatók oly módon, hogy végigvizsgáljuk a mammaglobin ami-

nosav szekvenciát HLA-A2-kötő peptidekre, ahogyan ez leírásra került: [Peoples és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 432 (1995), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő]. A HLA-A2 kiválasztása mint az antigén prezentáló molekula megfelelő, amikor a páciens expresszál HLA-A2-t (a kaukázusi embertípus körülbelül 50 százaléka expresszál HLA-A2-t). Az előre jelezhető HLA-A2-kötő peptidek megszintetizálhatók és antigén sajátosságra vizsgálhatók oly módon, hogy a szintetikus peptideket a T2 sejtvonalra rávisszük, ami olyan humán T-sejt/B-sejt fúziós termék, amely hibát hordoz az antigén prezentálásban, így a T2-sejtek felszínén a HLA-A2 molekulák hatékonyan feltölthetők exogén HLA-A2-kötő peptidekkel [Henderson és mtsai.: Science 255 1264 (1992), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő]. Ezt követően standard citotoxicitási vizsgálati eljárást hajtunk végre, amelynek során a peptiddel feltöltött T2-sejteket mammaglobint expresszáló emlőtumorból izolált, tumorba beszűrődő limfocitákból származó emlő-specifikus CTL-ekkel inkubáljuk [lásd például: Peoples és mtsai.; 432-433. oldalak, valamint Toso és mtsai.: Cancer Research 56 16 (1996), amely referenciák teljes egészükben a kitanítás részének tekintendők].

T_c-sejt epitópokat tartalmazó antigén sajátosságú mammaglobin peptideket azonosíthatunk a HLA I. osztályba tartozó molekulák által a tumorsejt felületén prezentált endogén peptidek savra történő elúciója segítségével [például: Peoples és mtsai.: lásd fentebb, 433. oldal]. Az eluált

peptidek a technika állása szerint ismert bármely eljárás segítségével elválaszthatók, beleértve HPLC frakcionálást. A különböző peptid frakciókat T2-sejtekre felvisszük és a feltöltött T2-sejteket emlőtumor specifikus CTL-ekkel inkubáljuk annak meghatározására, hogy standard immunbiológiai eljárásokat alkalmazva a CTL-ek mely peptideket ismernek fel.

A találmány szerinti mammaglobin-antigén egyik alkalmazási területe az alkalmazkodó immunterápia. Ez a kezelés magába foglalja mammaglobin elleni antitestet termelő B-sejtek és/vagy mammaglobint expresszáló tumorral rendelkező páciensből izolált mammaglobin specifikus citotoxikus T-limfociták *in vitro* aktiválását és expanszióját mammaglobin-antigénnel. Az eljárás végrehajtható olyan készítménnyel is, amely egyaránt tartalmazza a mammaglobin B-sejt és T_c-sejt antigéneket. Az aktivált limfocitákat ezt követően visszajuttatjuk a páciensbe az alkalmazkodó immunterápiához.

A találmány szerinti mammaglobin-antigén továbbá alkalmazható, mint mammaglobin specifikus vakcina komponense. A vakcina mammaglobin-antigén immunológiailag serkentő hatású mennyiségét tartalmazza. A leírás szerint immunológiailag serkentő hatású mennyiség alatt antigén azon mennyiségét értjük, amely képes a kívánt immunválaszt kiváltani mellrák tüneteinek enyhítésére vagy kezelésére a befogadó szervezetben. Ez a mennyiség kísérleti alapon megállapítható a szakember számára jól ismertnek feltételezhető standard eljárások segítségével, felesleges kísérletezés nélkül.

Az antigén számos vakcina formulázás bármelyikében biztosítható, amely képes a kívánt típusú immunválaszt - azaz antitest és/vagy sejt közvetített immunválasz - kiváltani. Ilyen formulázások a technika állása szerint ismertnek tekinthetők fel [lásd például: Lanzavecchia: Science 260 937 (1993) és Raychandhuri: 5,585,103 lajstromszámú US szabadalom, amely referenciák teljes egészükben a kitanítás részének tekintendők]. Az immunválaszok serkentésére szolgáló vakcina formulázásokra például szolgálhatnak az alábbi gyógyászatiilag elfogadható adjuvánsok: alumínium sók; szkvalén vagy szkvalén és muramil dipeptid emulziók; liposzómák; és egy stabilizáló detergenst, micellát létrehozó ágenst valamint biológiailag lebontható és biológiailag összeférhető olajat tartalmazó készítmény [Raychandhuri: lásd fentebb].

Egy mammaglobin specifikus vakcina hasonlóképpen tartalmazhat mammaglobin-antigénnel feltöltött hordozó sejtet is. Előnyösen a hordozó sejtet autolog, alapfunkciójukat tekintve antigén prezentáló sejtekből (APC) hozzuk létre, mint például makrofágokból, dendrites sejtekből vagy aktivált B- vagy T-limfocitákból. Lásd például: Lanzavecchia, 937. oldal, fentebb idézve. Az alapfunkciójukat tekintve APC-sejtek egy ligandot - B7 - expresszálnak, amely kötődik a CD28 vagy CTLA4 molekulákhoz T-sejteken, hogy ezzel antigén szempontjából közömbös ko-stimuláló szignált hozzon létre, amely mint szignál-2 ismert és amely megakadályozza a T-sejt allergiás érzéketlenséget vagy inaktiválódást. Így tehát a vakcina része lehet olyan interleukin-2 vagy más ko-stimuláló szignál is, amely ellene hat az allergiás ér-

zékettlenség indukálódásának [Lanzavecchia, 938. oldal, lásd fentebb].

Mammaglobin specifikus vakcina egy másik formulázását képezi olyan rekombinás vektor, amely mammaglobin-antigén expressziójára alkalmas nukleotid szekvenciát kódol. A technika állása szerint fertőző ágensek alkalmazása citotoxikus T-limfociták serkentésére ismertnek tételezhető fel [Raychandhuri, lásd fentebb]. Leírásra kerültek vaccinia-, polio-, adeno- és retrovírusokat, és hasonlóképpen baktériumokat - mint például *Listeria* és BCG - alkalmazó kiméra vektorok. Így például kimutatták, hogy egy kanárimadár himlő (canarypox) vírus vektor - ALVAC - erős sejtes immunválaszt vált ki a kódolt heterológ géntermékekkel szemben [Taylor és mtsai.: *Virology* 187 321 (1991), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő]. Továbbá a MAGE-1 gén által kódolt MZ2-E humán melanóma kilöködési antigént expresszáló rekombináns ALVAC képes a MAGE-1 CTL-aktivitások *in vitro* stimulálására egy MAGE-1 mRNS-t expresszáló emlőtumorból származó TIL populációban [Toso és mtsai.: lásd fentebb]. Egy másik megközelítés szerint - leírásra került a Weiner és mtsai.: 5,593,972 lajstromszámú US szabadalomban, amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő - a célba vett immunogén fehérje antigénjét kódoló rekombinás expressziós vektort közvetlenül juttatjuk be az egyénbe akár *in vivo* - azaz izomsejtekbe - vagy az egyén sejtjeibe *ex vivo* olyan ágenssel együtt, amely elősegíti a DNS felvételét a sejtekbe.

A szakember könnyen meghatározhatja olyan vakcina formulázását, amely képes a kívánt immunválaszt létrehozni. Így például egy mammaglobin elleni antitestek *in vivo* termelésének indukálására szolgáló mammaglobin specifikus vakcina legalább egy olyan mammaglobin B-sejt antigént tartalmaz, amelyben B-sejt epitóp és T_H -sejt epitóp található. A T_H -sejt epitóp előnyösen illeszkedik a tervbe vett vakcina befogadó szervezet megfelelő MHC II. osztály haplotípusához. Alternatív módon olyan T_H -sejt epitópot alkalmazhatunk, amelyről ismert, hogy az emberi szervezet egyetemlegesen felismeri a HLA-típustól függetlenül, mint például a tetanusz toxoidból származó "univerzális" T-sejt epitóp [Panina-Bordignon és mtsai.: Eur. J. Immunol. 19 2237 (1989), amely referencia teljes egészében a kitanítás részének tekintendő]. Előnyösen a vakcina mammaglobin B-sejt antigének sokaságát tartalmazza, különböző HLA-típusok MHC II. osztály molekulák által felismert T_H -epitópokkal.

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint egy mammaglobin specifikus vakcina sejt közvetített választ indukálunk és a vakcina legalább egy olyan mammaglobin T_c -antigént tartalmaz, amely képes mammaglobin specifikus T_c -sejteket aktiválni. Előnyösen a vakcina számos T_c -sejt antigént tartalmaz.

Mammaglobin specifikus vakcina úgy is formulázható, hogy mind antitest, mint sejt közvetített válaszokat indukáljon. A találmány ezen megvalósítási módja szerint mammaglobin B-sejt és T_c -sejt antigéneket egyaránt alkalmazunk.

Mammaglobint expresszáló tumorral rendelkező páciens kezelhető oly módon, hogy a páciensnek a találmány szerinti mammaglobin specifikus vakcina immun-stimulációra képes mennyiségét adjuk be. A vakcina bejuttatása bármely ismert vagy standard úton megvalósítható. Ezek nem korlátozó jelleggel magukba foglalják az alábbiakat: intravénás, intra-peritoneális, intramuszkuláris, szubkután vagy emlőbe történő injektálás.

A találmány előnyös megvalósítási módjaira példákat mutatunk be az alábbiakban. Felhívjuk a figyelmet arra, hogy az ismertetésre kerülő specifikációk, megvalósítási módok és példák csupán a találmány jobb megérthetőségét szolgálják és nem korlátozó értelemben kerültek bemutatásra. A szakember számára nyilvánvaló, hogy számos más, a fentiekkel egyenértékű módosítás illetve változtatás hajtható végre, és az ilyen módosítások nem térnek el a találmányi gondolattól és a csatolt szabadalmi igénypontok által meghatározott igényelt oltalmi körön belülinek tekintendők.

Az alábbi példákban említésre kerülő sejtvonalakat az Amerikai Típusgyűjteményből (American Type Culture Collection, ATCC) szereztük be és Dulbecco-féle minimális táptalajon tenyésztettük, amit 10% főtális borjúsavóval egészítettünk ki. A szöveti biopszia példányokat a Humán Együttműködési Szövet Hálózattól (Human Cooperative Tissue Network) szereztük be [LiVolsi és mtsai.: Cancer 71 1391 (1993); amely publikáció teljes egészében a kitanítás részének tekintendő].

1. példa

Ez a példa a mammaglobin cDNS izolálását mutatja be.

Az MDA-MB-415 sejtvonalból teljes sejt RNS-t izoláltunk a standard guanidínium-izotiocianát módszer segítségével [Belyavsky és mtsai.: lásd fentebb]. Ezt az RNS-t használtuk fel a RACE PCR eljárásban az Amplifinder reagens készletet alkalmazva (Clonetech) és a gyártó előírásait követve.

Az első cDNS-szál szintézisét standard reakció szerint végeztük, ahol a reakcióelegy az alábbiakat tartalmazta: 1 µg RNS, 10 µM D2R specifikus mammaglobin primer (5'-ATA AGA AAG AGA AGG TGT GG-3', 4. azonosítási szám szerinti szekvencia), 4 µl 5x RT-puffer (250 mM Trisz-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 2 µl 100 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP keverék és 200 egység Superscript™ II reverz transzkriptáz (Gibco/BRL) 20 µl reakcióelegyben. A reakciót 1 órán keresztül végeztük 45 °C-on és a leállításhoz 5 percig 95 °C-on inkubáltuk. Az RNS-t 400 µM NaOH segítségével 65 °C-on 30 percig hidrolizáltuk és 400 µM ecetsavval semlegesítettük.

Ezt követően a reakcióelegyet 3 térfogatnyi 6 M NaI-hoz és 10 µl kezelt üveggyöngyhöz adtuk. A gyöngyöket háromszor mostuk 80% etanollal és a nukleinsavat a gyöngyökről 45 µl vízben eluáltuk. Ezt követően a nukleinsavat precipitáltuk és 10 µl vízben újra felfuszpendáltuk. A tisztított első cDNS szálat a gyártó által biztosított lehorgonyzó oligonukleotidhoz ligáltuk (9. azonosítási szám szerinti szekvencia, 5'-CAC GAA TTC ACT ATC GAT TCT GGA ACC TTC AGA

GG-3'), T4 RNS-ligáz alkalmazásával 27 °C-on 20 órán keresztül. A ligálósos reakció egytizedét vettük a PCR amplifikáláshoz 50 µl reakcióelegyben, amely a következőket tartalmazta: 1 µM gyártó szerinti lehorgonyzó primer (10. azonosítási szám szerinti szekvencia, 5'-CTG GTT CGG CCC ACC TCT GAA GGT TCC AGA ATC GAT AG-3'), 1 µM D2Rb mammaglobin specifikus primer (11. azonosítási szám szerinti szekvencia, 5'-AAT CCG TAG TTG GTT TCT CAC C-3'), 200 µM dNTP keverék, 5 egység Vent™ DNS-polimeráz és 1x polimeráz puffer (10 mM KCl, 20 mM Trisz-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100). A reakciót először 94 °C-on 2 percig inkubáltuk majd 94 °C-on 45 másodpercig, 50 °C-on 1 percig és 72 °C-on 90 másodpercig tartottuk, összesen 40 cikluson keresztül.

A két 3'-irányban elhelyezkedő mammaglobin specifikus egymásba ágyazott oligonukleotid a következő volt: D2R (4. azonosítási szám szerinti szekvencia) és D2Rb (11. azonosítási szám szerinti szekvencia). Egy 5'-irányban elhelyezkedő mammaglobin specifikus kontroll oligonukleotidot - D2F, (12. azonosítási szám szerinti szekvencia, 5'-CTT TCT GCA AGA CCT TTG GC-3') - is alkalmaztunk, a gyártó javaslatai szerint. Az összes PCR amplifikálást Vent DNS-polimerázzal végeztük (New England Biolabs). Az amplifikált RACE terméket EcoRI-vel emésztettük és a pGEM7Z plazmid vektor (Promega, Madison, WI) EcoRI és SmaI helyeibe ligáltuk.

Az összes szekvenálást a Taq DNS-polimeráz termál ciklusos szekvenáló reagenskészlet alkalmazásával végeztük, a

gyártó (Promega) előírásai szerint. Röviden összefoglalva az eljárás a következő:

Tíz pmol szekvencia specifikus oligonukleotidot végjelöltünk 10 pmol ^{32}P - γ -ATP-vel (3000 Ci/mmol és 10 mCi/ml) T4 polinukleotid kinázt alkalmazva 10 μl reakcióban 30 percig 37 °C-on. 100 ng plazmid templátot, 1,5 pmol jelölt szekvenáló primert és 5 egység szekvenáló minőségű Taq polimerázt tartalmazó polimerizációs reakcióelegyet állítottunk össze 17 μl , a gyártó által biztosított szekvenáló pufferben. Ezt a reakcióelegyet négy reakciócsőbe szétosztottuk, ahol a csövek a gyártó által biztosított deoxinukleotid keveréket és a dideoxi-A, -C, -G vagy -T egyikét tartalmazták. A négy cső csoportját 95 °C-on inkubáltuk 2 percig, majd 30 cikluson át 94 °C-on 45 másodpercig, 45 °C-on 30 másodpercig és 72 °C-on 1 percig inkubáltuk. Miután a reakciók befejeződtek, minden egyes csőhöz 3 μl 80%-os formamid/brómfenolkék festék keveréket adtunk. A mintákat 70 °C-on 2 percig melegítettük, majd 6% akrilamid/7,5 M karbamid szekvenáló gélre felvittük és 2-4 órán keresztül futtattuk 60 W állandó teljesítmény mellett. A gél megszárítottuk és Kodak XAR5 röntgenfilmen exponáltuk 2-24 órán keresztül.

Az így kapott szekvencia egy 403 bázispár (bp) nagyságú fragmens volt (5. azonosítási szám szerinti szekvencia) ahogyan ez a 2. ábrán látható (teli sáv). Korábban a DEST002 Tag szekvenciát már izolálták [Watson és Fleming: lásd fentebb]. Ez a szekvencia egy 206 bp nagyságú fragmens volt (6. azonosítási szám szerinti szekvencia), ahogyan ez

a 2. ábrán látható (üres sáv). Az ezen két szekvenciából származó információ összevonása lehetővé tette az 503 bp nagyságú teljes hosszúságú mammaglobin cDNS szekvencia levezetését (2. ábra).

2. példa

Ez a példa bizonyítja, hogy a mammaglobin expresszió az emlőmirigy tumorsejtekre korlátozódik és - kisebb mértékben - normál emlőmirigy sejtekben is létrejön.

Teljes sejt RNS mintákat izoláltunk a standard guanidínium-izotiocianát módszer segítségével és RNáz mentes DNázsal kezeltek (Promega). RT/PCR analízishez a fentebb említett teljes RNS-ből 1 µg-ot reverz transzkripcióra vittünk oligo dT₂₁ (13. azonosítási szám szerinti szekvencia) és Superscript II reverz transzkriptáz (Gibco/BRL) jelenlétében, a gyártó előírásait követve.

Kétszáz ng oligo dT₂₁ (13. azonosítási szám szerinti szekvencia) és 1 µg teljes RNS keverékét inkubáltuk 65 °C-on 5 percre 10 µl térfogatban. A mintát jégen lehűtöttük és a következőket adtuk hozzá: 4 µl 5x RT puffer (250 mM Trisz-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 2 µl 100 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP keverék és 200 egység Superscript™ II reverz transzkriptáz (Gibco/BRL). A reakciót 1 óráig keresztül végeztük és leállítására a reakcióelegyet 95 °C-on 5 percre inkubáltuk.

Mindegyik RT reakció egytizedét PCR-analízisnek vetettük alá a következő mammaglobin specifikus primereket alkalmazva: D2R (5'-ATA AGA AAG AGA AGG TGT GG-3', 4. azono-

sítási szám szerinti szekvencia) és d2102 (5'-CAG CGG CTT CCT TGA TCC TTG-3', 3. azonosítási szám szerinti szekvencia); és 40 cikluson keresztül a standard reakciókörülmények a következők voltak: 94 °C, 30 másodperc / 55 °C, 1 perc / 72 °C, 1 perc.

Northern analízishez 20 µg teljes RNS-t analizáltunk ahogyan ez korábban már leírásra került [Watson és Fleming: lásd fentebb], a teljes hosszúságú mammaglobin cDNS-próbát alkalmazva. Minden egyes RNS minta integritását és egyenlő mennyiségű felvitelét etídium-bromid festéssel ellenőriztük.

Ahogyan ez a 4A. ábrán látható, az 500 bp nagyságú mammaglobin hírvivő könnyen kimutatható a 2410-es tumor mintában (az a szövet, amelyből ezt az eredeti DEST-et izolálták) és jóval kisebb mértékben normál humán emlőszövetben, de nem mutatható ki a halhatatlanná tett B5-589 emlő epiteliális sejtvonalban, vagy emberi tüdőben, méhlepényben, méhben és petefészekben (4A. ábra). Amplifikálást követően RT/PCR analízist alkalmazva mammaglobin expressziót még mindig nem tudtunk kimutatni 15 megvizsgált szövetben (4B. ábra). A gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) hírvivő (4B. ábra) és az EGF-receptor hírvivő (az adatok nem kerültek feltüntetésre) kimutatása ezekben a reakciókban bizonyította, hogy az expresszió hiánya nem magyarázható degradálódott RNS jelenlétével vagy más triviális okkal. Így a mammaglobin mRNS expressziója viszonylag specifikus az emlőszövet esetében.

3. példa

Ez a példa azt bizonyítja, hogy a mammaglobin cDNS lefordítható nukleotid szekvenciát kódol, amely a megfelelő előre jelezhető molekulatömeggel rendelkező fehérje termékhez vezet. *In vitro* transzlációkat végeztünk a TNT[™] nyúl retikulocita transzlációs reagenskészlet alkalmazásával T7 RNS-polimeráz (Promega) és ³⁵S-metionin (>1000 Ci/mmol; 10 mCi/ml, Amersham) jelenlétében, a gyártó előírásai szerint.

25 µl TNT[™] nyúl retikulocita lizátumhoz 2 µl, a gyártó által előállított reakciós puffert, T7 RNS-polimerázt, 20 µM metionin nélküli aminosav keveréket, 40 µCi ³⁵S-metionint (1000 Ci/mmol és 10 mCi/ml), 40 egység ribonukleáz inhibitor, 1 µg mammaglobin/pGEM7 plazmidot és elegendő mennyiségű DEPC-kezelt vizet adtunk, hogy a végső reakciótér fogat 50 µl legyen. Ezt a reakcióelegyet 30 °C-on 60 percig inkubáltuk. Ebből a reakcióelegyből 5 µl-t 20 µl SDS gélpufferbe átvittünk, 2 percig forraltuk és 17,5%-os SDS-poliakrilamid gélre felvittük.

A mammaglobin cDNS-sel "programozott" nyúl retikulocita lizátum egy 6 kDa molekulatömegű fehérjét termelt, míg az a minta, amelyhez nem adtunk cDNS-t, semmiféle fehérje terméket nem termelt.

4. példa

Ez a példa a mammaglobin túlexpressziójának előfordulását mutatja be primer emlő karcinóma esetében.

A mammaglobin túlexpresszió gyakoriságának meghatározására emlő karcinómák esetében tizenöt, különböző hisztoló-

giai típusú I. fázisú primer emlő karcinóma csoportot vizsgáltunk meg Northern-blott hibridizáció alkalmazásával a mammaglobin cDNS-próba segítségével. A pácienseknek megfelelő normál emlőszövet mintákat összehasonlítottuk két páciensből származó szövettel is (6. ábra). Az 500 bp nagyságú mammaglobin mRNS-t kimutattuk normál emlőszövetben és 2410-es tumorban és három másik tumorban, amelyek közül kettő a vizsgálat során kismértékű expressziót vagy az expresszió hiányát mutatta a páciensnek megfelelő normál szövetben (B015 összevetve a B016-tal; B022 összevetve a B023-mal; 6. ábra). Összességében a megvizsgált 15 tumor közül 4 (27%) túlexpresszálta a mammaglobin mRNS-t.

Ezek az adatok azt mutatják, hogy a mammaglobin túlexpressziója nem egyedülálló egyetlen tumor minta esetére és valószínűleg viszonylag gyakori a primer emlőtumorsejtek között. Továbbá az a tény, hogy az összes megvizsgált tumor I. fázisú volt, arra utal, hogy a szabályozásnak ez a szétesése viszonylag korán előfordul az emlő neoplázia progressziója során.

5. példa

Az alább következő példa a mammaglobin fehérje kimutatását illusztrálja mammaglobin elleni poliklonális antitest alkalmazva.

A mammaglobin elleni poliklonális antitest előállításához a mammaglobin cDNS-ből levezethető 16 C-terminális aminosavnak megfelelő peptidet (Glu-Val-Phe-Met-Gln-Leu-Ile-Tyr-Asp-Ser-Ser-Leu-Cys-Asp-Leu-Phe; 14. azonosítási szám

szerinti szekvencia) kapcsoltuk Keyhole Limpet Hemocyanin-hoz és Freund-féle adjuvánssal együtt nyulakba injektáltuk. A beoltott nyulak háromhetes időközökben gyorsító injekciót kaptak, a 12. héten a nyulaktól vért vettünk és a szérumot megvizsgáltuk mammaglobin kimutatási képességére az MDA-MB-415 és MCF-7 emlőtumor sejtvonalak tenyészetéből származó szérum mentes kondicionált táptalajban. Az MDA-MB-415 sejtvonalat korábban úgy azonosítottuk, mint egy mammaglobin hírvivőt túlexpresszáló sejtvonal és az MCF-7 sejtvonalat úgy azonosítottuk, mint egy kimutatható mennyiségű mammaglobin mRNS-t termelni képtelen sejtvonalat.

A kondicionált táptalajt 24 órás tenyészetből gyűjtöttük be és 12%-os SDS-akrilamid gélen választottuk szét redukáló körülmények között (azaz a mintát ditiotreitolt (DTT) és 2-merkaptoetanolt (BME) tartalmazó pufferben forraltuk, a diszulfid kötések redukációjához), Nytran filterre blottoltuk és standard Western-blott protokollok szerint analizáltuk; a vizsgálat során a fentebb leírt C-terminális peptid elleni antitestet alkalmazva, mint primer antitest. A primer antitest kötődése után a blottot mostuk és szekunder antitestet (kecskében termeltetett nyúl elleni antitest) adtunk hozzá. A mammaglobin-antitest komplexeket enzim-kapcsolt kemilumineszcencia segítségével tettük láthatóvá (ECL Western Blotting Detection Reagent, Amersham, Arlington Heights, IL).

A mammaglobin elleni poliklonális antitest egy körülbelül 21 kDa látszólagos molekulatömegű sávot mutatott ki az MDA-MB-415 sejttenyészet kondicionált táptalajában (az ada-

tok nem kerültek bemutatásra). Nem tudtunk sávot kimutatni az MCF-7 sejttenyészet kondicionált táptalajában (az adatok nem kerültek bemutatásra). Így az mRNS adatokkal egybevágóan az MDA-MB-415 sejtek szekretálnak mammaglobin fehérjét, míg az MCF-7 sejtek nem.

Az MDA-MB-415 sejttenyészet táptalajába kiválasztott mammaglobin látszólagos molekulatömege nagyobb, mint a 2. azonosítási szám szerinti szekvencia alapján levezethető aminosav szekvenciából számolt 10,5 kDa molekulatömeg. Miután csaknem az összes kiválasztásra kerülő fehérje glikozilált, az MDA-MB-415 sejtek citoszolját analizáltuk a mammaglobin elleni poliklonális antitesttel annak eldöntésére, hogy a kiválasztott mammaglobin bármely prekursor formája kimutatható-e.

MDA-MB-415 sejteket tenyésztettünk 24 órán keresztül szérum mentes táptalajon, a tenyésztáptalajt begyűjtöttük, lecentrifugáltuk és a kapott felülúszót összegyűjtöttük. A letapadó sejteket foszfát pufferolt fiziológiás sóoldattal (PBS) mostuk és 1x Laemmli-féle mintapufferrel lizáltuk (2% SDS; 10% glicerin; 100 mM DTT, 60 mM Trisz, pH 6,8; 0,001% brómfenolkék). A lizált keveréket 5 percre forraltuk és lecentrifugáltuk (10.000 g, 5 perc), a sejtörmelék kiüleptetésére. A sejt lizátumot egy új csőbe átvittük és az alább leírtak szerint Western-blott analízisnek vetettük alá.

A tenyészet felülúszóját és a sejt lizátumot 12% SDS-akrilamid gélen futtattuk redukáló körülmények között (azaz a mintákat DTT-t és BME-t tartalmazó pufferben forraltuk) és standard eljárásokat alkalmazva PVDF membránra blottol-

tuk. A blottot a C-terminális peptid elleni poliklonális antitesttel vizsgáltuk az antitest előállításánál alkalmazott leszorító peptid jelenlétében és annak hiányában.

A mammaglobin-antitest komplexek láthatóvá tételét a fentebb leírtak szerint végeztük. Ahogyan ez a 7. ábrán látható, a leszorító peptid hiányában (-) a kondicionált táptalaj (S) tartalmazza a 21 kDa sávot, amely jellemző a szekretált mammaglobin fehérjére. A sejt lizátum (C) egy erőteljes, körülbelül 14 kDa molekulatömegű sávot és számos magasabb molekulatömegű sávot mutatott, beleértve egy, körülbelül 21 kDa molekulatömeget mutató sávot. Amikor a Western-blottot a leszorító peptid (+) jelenlétében végeztük, a szekretált forma és a mammaglobin intracelluláris formái nem láthatóak, ezzel jelezve, hogy ezek a fehérjék tartalmazzák azt a peptidet, amely ellen az antitestet megszintetizáltuk.

A csak a sejt lizátumban kimutatható 14 kDa sáv valószínűleg egy prekursor, vagy feldolgozás nélküli mammaglobin formát jelez. Miután a mammaglobinra előre jelezhető aminosav szekvencia tartalmazza az Asn-X-Thr konszenzus N-glikozilációs helyet - a 2. azonosítási szám szerinti szekvenciában az 53-55. és a 68-70. aminosavak között elhelyezkedve - a megfigyelt, kiválasztásra kerülő 21 kDa forma valószínűleg a fehérje valamely glikozilált formájának felel meg.

Ezt a hipotézist úgy vizsgáltuk meg, hogy MDA-MB-415 sejteket tenyésztettünk tunicamicin jelenlétében és hiányában, amely hatóanyag blokkolja az eukarióta fehérjék N-

kapcsolt glikozilációját. Tunicamicint adtunk két azonos tenyészet közül az egyikhez 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban és mindkét tenyészetet éjszakán át tovább inkubáltuk. A kezelt és a kontroll tenyészetekből származó sejt lizátumot előkészítettük és a fentebb leírtak szerint Western-blott analízis segítségével megvizsgáltuk.

Ahogy ez a 8. ábrán látható, a tunicamicinnel kezelt (+) tenyészetekből (S) származó táptalajban nem található kimutatható szintű szekretált mammaglobin, ezzel arra utalva, hogy a szekretált mammaglobin glikozilált. Meglepő módon, a mammaglobin sejt citoszoljában található formája (14 kDa) úgyszintén nem volt kimutatható a tunicamicinnel kezelt MDA-MB-415 sejtek lizátumaiban (jobb szélső pálya). Azt tételezzük fel, hogy a korai glikozilációs események tunicamicinnel végzett blokkolása a mammaglobin prekursor formáinak instabilitásához és lebomlásához vezet, ezzel magyarázva a kimutatható mennyiségű 14 kDa fehérje hiányát a tunicamicinnel kezelt sejtek citoszoljában.

A mammaglobin C-terminális peptid elleni poliklonális antitest hasonlóképpen kimutatta a mammaglobin 14 kDa prekursor formájának a jelenlétét primer humán emlőtumor mintákból származó sejt lizátumokban. Ahogy ez a 9. ábrán látható, a mammaglobin prekursor formája megtalálható a B023 tumor mintában, de nem mutatható ki az ugyanazon páciensből származó normál emlőszövet mintában (B022). Érdekes módon néhány tumor minta - amely expresszálja a mammaglobin transzkriptumot (azaz 087R, 014, 75A és 2410) - nem tartalmaz kimutatható szintű mammaglobin fehérjét, ahogy ez

megvizsgálható Western-blott analízis segítségével. Az ezen adatokkal egybevágó egyik hipotézis szerint a mammaglobin expresszió eltérő módon szabályozódik a transzkripció és a transláció szintjén és ezt az eltérő szabályozást a tumor fejlődési fázisa határozza meg.

A mammaglobin elleni poliklonális antitestet alkalmaztuk szekretált mammaglobin megkeresésére a proliferáló emlőmirigyből származó emlő szekréciókban. Kolosztrumot vagy érett tejfolyadékot (500 µl-es minták) gyűjtöttünk terhes nőktől kézi fejéssel az első és a harmadik trimeszter során, szüléskor és a szülés utáni 3., 14. és 21. napon. A mintákat egyenlő térfogatú 2x Laemmli-féle mintapufferrel hígítottuk (4% SDS; 20% glicerin; 200 mM DTT; 120 mM Trisz, pH 6,8; 0,002% brómfenolkék). A hígított mintákat 5 percig forraltuk, majd ezt követően lecentrifugáltuk (10.000 g, 5 perc, 4 °C) a sejttörmelék leüleptítésére. A denaturált mintákat új csőbe vittük át és -20 °C-on tároltuk a fentebb leírtak szerint végzett Western-blott analízist megelőzően.

Ahogy ez a 10. ábrán látható, az antitest kimutatta a 21 kDa nagyságú szekretált mammaglobint a terhesség során begyűjtött emlő szekréció mintákban, amikor az emlő epitél sejtek proliferációja magas. Azonban a szoptatás kezdetével - ami az emlő epitélium differenciálódásának az állapota - a mammaglobin szintek jelentős mértékben lecsökkentek a szülés utáni 3. napra és nem volt többé kimutatható a szülés utáni 14. nappal. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a szekretálódó mammaglobin proliferáló emlő epiteliális sejtekkel áll kapcsolatban, amely megfigyelés összevág a

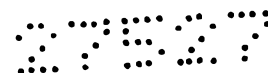
szekretált mammaglobin kimutatásával humán mellrák esetében.

A mammaglobin peptid elleni antitesttel mutatott reaktivitást kimutattuk emlőtumor sejtek esetében is emlőrákos betegből származó minta paraffinban rögzített metszeteinek immun-hisztokémiai festésével (11. ábra). Az immun-hisztokémiai festést a mammaglobin peptid elleni antitestet, mint primer antitestet alkalmazva végeztük, és utána a mammaglobin-antitest komplexet torma peroxidázzal jelölt, kecskében termeltetett nyúl elleni antitestet és szubsztrátként 3,3'-diamino-benzol tetrahidro-kloridot (DAB) alkalmazva mutattuk ki. A mammaglobin fehérjét expresszáló sejtek barna festődést mutattak.

Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a mammaglobin fehérje, mint prekursor fehérje szintetizálódik és poszt-transzlációs módosítások, mint például N-kapcsolt glikoziláció növeli látszólagos molekulatömegét a szekréciót megelőzően, továbbá, hogy a mammaglobin prekursor formáinak stabilitása az N-kapcsolt glikozilációtól függ, és hogy a mammaglobin fehérjét proliferáló emlőtumor sejtek választják ki. Mammaglobin fehérje kimutatása alkalmazható rák diagnosztikájára, a mammaglobin fehérjét mint emlőtumor markert használva, az emlőtumor kiújulásának vizsgálatára, autolog csontvelő/őssejt transzplantátumok vizsgálatára a szennyező tumorsejtek felderítésére és emlőtumor sejtek megcélzására terápiás beavatkozás esetében antitest-közvetített komplexek segítségével. A tisztított és izolált mammaglobin polipeptid jól alkalmazható antitestek létreho-

zására emlőtumorokkal szemben és további tumor specifikus immunterápiás kezelési rendszerek kifejlesztésére.

Felhívjuk a figyelmet arra, hogy a megelőzőekben ismertett specifikációk, megvalósítási módok és példák, valamint a csatolt rajzok csupán a találmány jobb megérthetőségét szolgálják és nem korlátozó értelemben kerültek bemutatásra. Számos más, a fentiekkel egyenértékű módosítás illetve változtatás hajtható végre, és az ilyen módosítások nem térnek el a találmányi gondolattól és a csatolt szabaddalmi igénypontok által meghatározott igényelt oltalmi körön belülnek tekintendők.



SZEKVENCIALISTA

AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 503 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS-mRNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENZS: nem

AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GACAGCGGCT TCCTTGATCC TTGCCACCCG CGACTGAACA CCGACAGCAG CAGCCTCACC
60

ATGAAGTTGC TGATGGTCCT CATGCTGGCG GCCCTCTCCC AGCACTGCTA CGCAGGCTCT
120

GGCTGCCCCCT TATTGGAGAA TGTGATTTCC AAGACAATCA ATCCACAAGT GTCTAAGACT
180

GAATACAAAG AACTTCTTCA AGAGTTCATA GACGACAATG CCACTACAAA TGCCATAGAT
240

GAATTGAAGG AATGTTTTCT TAACCAAACG GATGAACTC TGAGCAATGT TGAGGTGTTT
300

ATGCAATTAA TATATGACAG CAGTCTTTGT GATTTATTTT AACTTTCTGC AAGACCTTTG
360

GCTCACAGAA CTGCAGGTA TGGTGAGAAA CCAACTACGG ATTGCTGCAA ACCACACCTT
420

CTCTTTCTTA TGTCTTTTCTA CTACAAACTA CAAGACAATT GTTGAAACCT GCTATACATG
480

TTTATTTTAA TAAATTGATG GCA
503

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

27827

HOSSZA: 93 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

MOLEKULATÍPUS: protein

HIPOTETIKUS: nem

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 21 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENZS: nem

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CAGCGGCTTC CTTGATCCTT G

A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENZ: nem

A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATAAGAAAGA GAAGGTGTGG

20

AZ 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 403 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS-mRNS

HIPOTETIKUS: nem

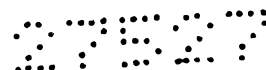
ANTISZENZ: nem

AZ 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GACAGCGGCT TCCTTGATCC TTGCCACCCG CGACTGAACA CCGACAGCAG CAGCCTCACC
60

ATGAAGTTGC TGATGGTCCT CATGCTGGCG GCCCTCTCCC AGCACTGCTA CGCAGGCTCT
120

GGCTGCCCCCT TATTGGAGAA TGTGATTTCC AAGACAATCA ATCCACAAGT GTCTAAGACT
180



GAATACAAAG AACTTCTTCA AGAGTTCATA GACGACAATG CCACTACAAA TGCCATAGAT
240

GAATTGAAGG AATGTTTTCT TAACCAAACG GATGAAACTC TGAGCAATGT TGAGGTGTTT
300

ATGCAATTAA TATATGACAG CAGTCTTTGT GATTATTTT AACTTTCTGC AAGACCTTTG
360

GCTCACAGAA CTGCAGGGTA TGGTGAGAAA CCAACTACGG ATT
403

A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 206 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS-mRNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENZ: nem

A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TTTATGCAAT TAATATATGA CAGCAGTCTT TGTGATTAT TTAACTTTC TGCAAGACCT
60

TTGGCTCACA GAACTGCAGG GTATGGTGAG AAACCAACTA CGGATTGCTG CAAACCACAC
120

CTTCTCTTTC TTATGTCTTT TTACTACAAA CTACAAGACA ATTGTTGAAA CCTGCTATAC
180

ATGTTTATTT TAATAAATTG ATGGCA
206

A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 95 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: protein

HIPOTETIKUS: nem

A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met	Lys	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Val	Thr	Ile	Pro	Ile	Cys	Cys
1				5					10					15	
Tyr	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Cys	Ser	Ile	Leu	Asp	Glu	Val	Ile	Arg	Gly
			20					25					30		
Thr	Ile	Asn	Ser	Thr	Val	Thr	Leu	His	Asp	Tyr	Met	Lys	Leu	Val	Lys
		35					40					45			
Pro	Tyr	Val	Gln	Asp	His	Phe	Thr	Glu	Lys	Ala	Val	Lys	Gln	Phe	Lys
	50					55				60					
Gln	Cys	Phe	Leu	Asp	Gln	Thr	Asp	Lys	Thr	Leu	Glu	Asn	Val	Gly	Val
65					70				75					80	
Met	Met	Glu	Ala	Ile	Phe	Asn	Ser	Glu	Ser	Cys	Gln	Gln	Pro	Ser	
				85				90						95	

A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 91 aminosav

TÍPUSA: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: protein

HIPOTETIKUS: nem

A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 35 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CACGAATTCA CTATCGAATC TGGAACCTTC AGAGG

35

A 10. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 38 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 10. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTGGTTCGGC CCACCTCTGA AGGTTCCAGA ATCGATAG

38

A 11. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 22 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENZS: nem

A 11. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AATCCGTAGT TGGTTTCTCA CC

22

A 12. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 20 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENZS: nem

A 12. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTTCTGCAA GACCTTTGGC

20

A 13. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 21 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS-mRNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENSZ: nem

A 13. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT T

21

A 14. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 16 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

HIPOTETIKUS: nem

A 14. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Glu Val Phe Met Gln Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Leu Cys Asp Leu

1

5

10

15

Phe

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Mammaglobin specifikus vakcina, amely legalább egy mammaglobin-antigén immunogénként hatásos mennyiségét tartalmazza és a mammaglobin-antigén a 2. azonosítási szám szerinti szekvenciából legalább hat, egymást közvetlenül követő aminosavat tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti vakcina, amelyben a mammaglobin-antigén egy hordozó sejt felületén található.

3. Az 1. igénypont szerinti vakcina, amely gyógyászati-
lag elfogadható adjuvánst tartalmaz.

4. Az 1. igénypont szerinti vakcina, amely mammaglobin B-sejt antigének és mammaglobin T_C-sejt antigének keverékét tartalmazza.

5. Rekombináns vektort tartalmazó mammaglobin specifikus vakcina, amely vektor mammaglobin B-sejt antigén és/-
vagy mammaglobin T_C-sejt antigén expresszióját kódoló nukleotid szekvenciát tartalmaz.

6. Eljárás mammaglobint expresszáló tumort hordozó páciens kezelésére, *azzal jellemezve*, hogy a páciensnek mammaglobin-antigén immunogénként hatásos mennyiségét tartalmazó mammaglobin specifikus vakcinát adunk be.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az antigént hordozó sejtre visszük fel.

8. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a vakcinához gyógyászati-
lag elfogadható adjuvánst adunk.

9. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vakcinához rekombinás vektorban nukleotid szekvencia által kódolt expresszállható aminosav szekvenciát adunk.

10. Eljárás mammaglobint expresszálló emlőtumort hordozó páciens kezelésére, azzal jellemezve, hogy:

a tumorból mammaglobin specifikus limfocitákat izolálunk;

a limfocitákat legalább egy mammaglobin-antigénnel aktiváljuk; és

az aktivált limfocitákat a páciensnek beadjuk.

11. A 2. azonosítási szám szerinti szekvenciából legalább hat egymást közvetlenül követő aminosavat magába foglaló legalább egy mammaglobin-antigént tartalmazó izolált és tisztított polipeptid, amely mammaglobin-antigént a természetes körülmények között előforduló, glikozilált és a 2. azonosítási szám szerinti szekvencia 20-93. aminosavait tartalmazó, szekretált mammaglobin polipeptidre specifikus B-sejtek és/vagy T_c-sejtek képesek felismerni.

12. A 11. igénypont szerinti izolált és tisztított polipeptid, amelyben a mammaglobin-antigén a 2. azonosítási szám szerinti szekvenciából legalább 12 egymást közvetlenül követő aminosavat tartalmaz.

13. A 12. igénypont szerinti izolált és tisztított polipeptid, amelyben a mammaglobin-antigén a 2. azonosítási szám szerinti szekvenciából legalább 25 egymást közvetlenül követő aminosavat tartalmaz.

14. A 13. igénypont szerinti izolált és tisztított polipeptid, amelyben a mammaglobin-antigén glikozilált, és

a 2. azonosítási szám szerinti szekvenciából a 20-93. aminosavakat tartalmazza.

15. A 13. igénypont szerinti izolált és tisztított polipeptid, amelyben a mammaglobin-antigén glikozilált és a 2. azonosítási szám szerinti szekvenciát tartalmazza.

16. A 11. igénypont szerinti izolált és tisztított polipeptid, amelyben a mammaglobin-antigén mammaglobin B-sejt antigén, amely mellrákban szenvedő betegből származó B-sejtek *in vitro* aktiválását és expanszióját indukálja.

17. A 16. igénypont szerinti izolált és tisztított polipeptid, amelyben a mammaglobin B-sejt antigén heterológ fehérjéből származó T_H-sejt epitópot tartalmaz.

18. A 11. igénypont szerinti izolált és tisztított polipeptid, amelyben a mammaglobin-antigén mammaglobin T_c-sejt antigén, amely mellrákban szenvedő betegből származó T_c-sejtek *in vitro* aktiválását és expanszióját indukálja.

19. A 18. igénypont szerinti izolált és tisztított polipeptid, amelyben a mammaglobin T_c-sejt antigén a 2. azonosítási szám szerinti szekvenciából 8 vagy 9 egymást közvetlenül követő aminosavat tartalmaz.

20. A 11. igénypont szerinti izolált és tisztított polipeptid, amely mammaglobin B-sejt antigént és mammaglobin T_c-sejt antigént tartalmaz.

A meghatalmazott:


DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft
Dr. Pethő Árpád
szabadalmi ügyvivő