

Új fehérje és alkalmazása

K I V O N A T

A találmány tárgyát képezi új szekretált fehérje vagy abból származó részpeptid, vagy sója, eljárás a fehérje vagy a fehérjét vagy hasonlót tartalmazó gyógyászati készítmény előállítására, a fehérjére specifikus antitest, eljárás/készlet a fehérje aktivitását fokozó vagy gátló vegyület, vagy sója szűrésére, a szűrés eredményeként kapott vegyület, a fehérjét vagy hasonlót tartalmazó gyógyászati készítmény.

A találmány szerinti fehérje, részpeptid, vagy hasonló alkalmazhatók szövetregeneráló szerként beteg szövetek kivágását követően vagy diagnosztikai szerként rákhoz, és hasonlókhöz. A találmány szerinti antitest alkalmazható a találmány szerinti fehérje vizsgálandó mintákban való kvantitatív meghatározására. A találmány szerinti fehérje alkalmazható továbbá reagensként a találmány szerinti fehérje aktivitását fokozó vagy gátló vegyület szűréséhez.

Jellinek^u abra: Ø



Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

Új fehérje és alkalmazása

A találmány tárgyát képezi új szekretált fehérje vagy részpeptidje, eljárás a fehérje vagy azt tartalmazó gyógyászati készítmény előállítására, a gyógyászati készítmény, a fehérjére specifikus antitest, eljárás és reagenskészlet a fehérje aktivitását fokozó vagy gátló vegyület szűrésére (szkrínelésére), az így kapott vegyület.

A találmány szerinti fehérje előnyösen alkalmazható diagnosztikai szerként és reagensként.

Az eddig felfedezett onkogének között sok sejtproliferációs faktor gén vagy receptorgén található, így például az agyi tumorokhoz kapcsolódó PDGF [Ross és mtsai., Nature 362, 801 (1993)], az emlőrákhoz kapcsolódó erb-B és erb-B2 [Cell, 35, 718 (1983); Burden, S., Neuron 18, 847 (1997)], és hasonló, továbbá számos egyéb gén is, így például a vastagbél- és végbélrákhoz kapcsolódó, a szignáltranszdukciót elősegítő K-ras, a leukémiákban szerepet játszó N-ras, az ugyancsak a leukémiákban, valamint többek között emlő- és gyomorrákban részt vevő c-myc, amely a sejtproliferációt elősegítő gént aktiváló transzkripciós faktorhoz kapcsolódik [Maheswaran, Mol. Cell Biol. 14(2), 1147 (1994)], a neuroblasztómákhoz kapcsolódó N-myc

[Schwab, Nature 305, 245 (1983)], a tüdőrákokhoz kapcsolódó L-myc [Nau, Nature 318, 69 (1985)], továbbá a follikuláris B-sejt limfómához, emlőrákokhoz, nyaki rákokhoz kapcsolódó Bcl-2, Bcl-1, MDM2 és hasonló fehérjék, valamint a p53* tumorszuppresszálo fehérjével antagonizáló fehérjék [Reed, Nature 387, 773 (1987); Donehower, Nature 356, 215 (1992)]. E gének mellett számos olyan gént is találtak, amelyek szuppresszálják a rákos sejtek proliferációját. Ilyenek például az APC, a DPC4, az NF-1, az NF-2, az MTS1, az RB, a P53 és a WT 1 [Weinberg, Scientific American 32, (1996. szeptember)]. Ezeket géneket sejtek vagy szövetek malignus transzformációjakor talált specifikus fehérjék elemzésekor kapott aminosavszekvencia-adatok alapján azonosították és a felismerések részletei igen változatosak. Az eddig felismert ilyen gének önmagukban nem elegendőek ahhoz, hogy megmagyarázzuk általuk az onkogenezist és/vagy a rákból való gyógyulást.

A jelenleg is folyó humán génelemzés eredményeként továbbá számos olyan nukleotidszekvenciát találtak, amelyek EST-eket ('expressed sequence tag'; expresszált szekvencia-címke) tartalmaznak és ismeretlen funkciójúak.

Kíváncsossá vált tehát egy új, rákellenes kezelő vagy megelőző szer kifejlesztése úgy, hogy ismeretlen funkciójú EST-k közül tumorspecifikus fehérjéket kódoló gének azonosítunk.

Az alábbiakban ismertetjük a találmányt.

Beható vizsgálatokat folytattunk a fenti probléma megoldása érdekében és ennek eredményeként egy olyan

szekretált fehérje génjét azonosítottuk, amelynek nukleotidszekvenciája - EST-k nukleotidszekvenciája alapján - új, és felismertük, hogy az általa kódolt szekretált fehérje tumorsejtekben specifikusan expresszálódik.

A fenti és egyéb felismerések alapján elvégzett további vizsgálatok alapján alkottuk meg a találmányt.

A találmány tárgyát képezi tehát többek között:

(1) Fehérje, vagy sója, amely az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciával azonos vagy lényegében azonos aminosavszekvenciát tartalmaz;

(2) Az (1) szerinti fehérje, vagy sója, amelyben az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciával lényegében azonos aminosavszekvencia az 5. azonosítószámú aminosavszekvencia;

(3) Az (1) szerinti fehérje, vagy sója, amely rákos sejtekben termelődik;

(4) Az (1) szerinti fehérjéből származó részpeptid, vagy sója;

(5) A (4) szerinti részpeptid, vagy sója, amelynek aminosavszekvenciája megegyezik az 1. azonosítószámú aminosavszekvencia 26-34. aminosavaival;

(6) A (4) szerinti részpeptid, vagy sója, amelynek aminosavszekvenciája megegyezik az 5. azonosítószámú aminosavszekvencia 166-190. aminosavaival;

(7) Eljárás az (1) szerinti fehérje vagy a (4) szerinti részpeptid, vagy sója előállítására, amelynek során az (1) szerinti fehérjét vagy a (4) szerinti részpeptidet kódoló DNS-t tartalmazó rekombináns vektort hordozó

transzformánst tenyésztünk, amelynek eredményeként a fehérje vagy a részpeptid képződik;

(8) Antitest az (1) szerinti fehérje vagy a (4) szerinti részpeptid, vagy sója ellen;

(9) A (8) szerinti antitest, amely monoklonális antitest;

(10) A (8) szerinti antitest, amely az 1. azonosítószámú aminosavszekvencia 26-34. aminosavaival megegyező aminosavszekvenciájú (4) szerinti részpeptidre, vagy sójára specifikus;

(11) A (8) szerinti antitest, amely az 5. azonosítószámú aminosavszekvencia 166-190. aminosavaival megegyező aminosavszekvenciájú (4) szerinti részpeptidre, vagy sójára specifikus;

(12) Diagnosztikai szer, amely (8) szerinti antitestet tartalmaz;

(13) Gyógyászati készítmény, amely (1) szerinti fehérjét, (4) szerinti részpeptidet, vagy sóját, vagy (8) szerinti antitestet tartalmaz;

(14) Eljárás olyan vegyület, vagy sója szűrésére (sceening), amely fokozza vagy gátolja az (1) szerinti fehérje vagy a (4) szerinti részpeptid, vagy sója aktivitását, azzal jellemezve, hogy az (1) szerinti fehérjét vagy a (4) szerinti részpeptidet, vagy sóját alkalmazzuk;

(15) A (14) szerinti eljárás, amelyben az aktivitás sejtproliferációs aktivitás;

(16) Reagenskészlet olyan vegyület, vagy sója szűrésére, amely fokozza vagy gátolja az (1) szerinti fehérje

vagy a (4) szerinti részpeptid, vagy sója aktivitását, és amely (1) szerinti fehérjét vagy (4) szerinti részpeptidet, vagy sóját tartalmazza;

(17) Vegyület, vagy sója, amely fokozza vagy gátolja az (1) szerinti fehérje vagy a (4) szerinti részpeptid, vagy sója aktivitását, és amelyet a (14) szerinti szűrési eljárással vagy a (16) szerinti szűrő reagenskészlet segítségével állíthatunk elő;

(18) Gyógyászati készítmény, amely olyan vegyületet tartalmaz, vagy sóját tartalmazza, amely fokozza vagy gátolja az (1) szerinti fehérje vagy a (4) szerinti részpeptid, vagy sója aktivitását, és amelyet a (14) szerinti szűrési eljárással vagy a (16) szerinti szűrő reagenskészlet segítségével állíthatunk elő;

(19) A (18) szerinti gyógyászati készítmény, amely rák megelőzésére vagy kezelésére való;

A találmány tárgyát képezi továbbá többek között:

(20) Az (1) szerinti fehérje, vagy sója, amelyben az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciával lényegében azonos aminosavszekvencia legalább 70%-os, előnyösen legalább 80%-os, még előnyösebben legalább 90%-os, és még ennél is előnyösebben legalább 95%-os homológiát mutat az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciával;

(21) Az (1) szerinti fehérje, vagy sója, amelyben az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciával lényegében azonos aminosavszekvencia (1) 1-5 (előnyösen 1-3) aminosav deléciójával jön létre az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciából, (2) 1-10 [előnyösen 1-5 (még előnyösebben 1-3)]

aminosav addíciójával jön létre az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciából, (3) 1-5 (előnyösen 1-3) aminosav szubsztitúciójával jön létre az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciából, vagy (4) a fentiek valamely kombinációjával jön létre.

(22) A (14) szerinti szűrési eljárás, amelynek során (i) az (1) szerinti fehérjét vagy a (4) szerinti részpeptidet, vagy sóját egy szubsztráttal érintkeztetjük, (ii) a szubsztrátot és egy vizsgálandó vegyületet az (1) szerinti fehérjével vagy a (4) szerinti részpeptiddel, vagy sójával érintkeztetjük, minden egyes esetben megmérjük az (1) szerinti fehérje vagy a (4) szerinti részpeptid, vagy sója aktivitását, majd összehasonlítjuk a kapott aktivitási értékeket;

(23) Gyógyászati készítmény, amely olyan vegyületet tartalmaz, vagy sóját tartalmazza, amely fokozza az (1) szerinti fehérje vagy a (4) szerinti részpeptid, vagy sója aktivitását, és amelyet a (14) szerinti szűrési eljárással vagy a (16) szerinti szűrő reagenskészlet segítségével állíthatunk elő;

(24) A (23) szerinti gyógyászati készítmény, amely szövetregeneráló szer beteg szövetek kivágását követő alkalmazásra;

(25) Gyógyászati készítmény, amely olyan vegyületet, vagy sóját tartalmazza, amely gátolja az (1) szerinti fehérje vagy a (4) szerinti részpeptid, vagy sója aktivitását, és amelyet a (14) szerinti szűrési eljárással vagy a

(16) szerinti szűrő reagenskészlet segítségével állíthatunk elő;

(26) A (25) szerinti gyógyászati készítmény, amely rák kezelésére vagy megelőzésére való;

(27) Eljárás az (1) szerinti fehérje vagy a (4) szerinti részpeptid, vagy sója kvantitatív meghatározására, amelynek során a (8) szerinti antitestet kompetitíven reagáltatjuk a vizsgálandó oldattal és az (1) szerinti fehérje vagy a (4) szerinti részpeptid, vagy sója jelölt formájával, majd meghatározzuk az (1) szerinti fehérje vagy a (4) szerinti részpeptid, vagy sója jelölt formája antitesthez kötött részének arányát; és

(28) Eljárás az (1) szerinti fehérje vagy a (4) szerinti részpeptid, vagy sója kvantitatív meghatározására, amelynek során a vizsgálandó oldatot hordozón immobilizált (8) szerinti antitesttel és a (8) szerinti antitest jelölt formájával egyszerre, vagy egymás után reagáltatjuk, majd megmérjük a jelölés aktivitását az immobilizáló hordozón;

A találmány tárgyát képezi továbbá:

(29) Hibridóma, amely (9) szerinti antitestet tud termelni;

(30) A (8) szerinti antitest, amely neutralizáló antitest;

(31) A (8) szerinti antitest, amely humanizált antitest;

(32) Gyógyászati készítmény, amely (31) szerinti antitestet tartalmaz;

(33) A (32) szerinti gyógyászati készítmény, amely rák kezelésére vagy megelőzésére való;

(34) Gyógyászati készítmény, amely olyan vegyületet, vagy sóját tartalmazza, amely gátló aktivitást fejt ki az (1) szerinti fehérje vagy a (4) szerinti részpeptid, vagy sója természetes ölő ("killer") sejtek proliferációját gátló hatására;

(35) A (34) szerinti gyógyászati készítmény, amely rák kezelésére vagy megelőzésére való; és így tovább.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz tartozó ábrákat.

Az 1. ábrán az 1. példában kapott, találmány szerinti fehérjét kódoló DNS nukleotidszekvenciája, és a levezetett aminosavszekvencia látható.

A 2. ábrán egy, a 2. példában végzett Northern-blot eredményeit bemutató elektroforetogramm látható. Az A-részben (normál szövetek): 1. sáv - agy, 2. sáv - szív, 3. sáv - vázizom, 4. sáv - vastagbél, 5. sáv - csecsemőmirigy, 6. sáv - lép, 7. sáv - vese, 8. sáv - máj, 9. sáv - vékonybél, 10. sáv - méhlepény, 11. sáv - tüdő, 12. sáv - perifériás vér. A B-részben (rákos sejtek): 1. sáv - HL60 promielocitikus leukémiás sejt, 2. sáv - HeLa nyaki rák sejt, 3. sáv - K562 krónikus mielogén leukémiás sejt, 4. sáv - MOLT4 limfoblasztomás leukémiás sejt, 5. sáv - Raji Burkitt-limfóma sejt, 6. sáv - SW480 vastagbélrák sejt, 7. sáv - A549 tüdőrák sejt, 9. sáv - G361 melanóma sejt.

A 3. ábrán egy, a 2. példában végzett Northern-blot eredményeit bemutató elektroforetogramm látható. A C-1-ben: 1. sáv - RERF-LC-A1 humán tüdőrák sejt, 2. sáv - NCI-H345 humán tüdőrák sejt, 3. sáv - NCI-H460 humán tüdőrák sejt, 4. sáv - NCI-H1299 humán tüdőrák sejt, 5. sáv - MRC-5 normál humán fetális fibroblaszt sejt, 6. sáv - WI-38 normál humán fetális fibroblaszt sejt, 7. sáv - HT-29 vastagbél/végbélrák sejt, 8. sáv - WiDr vastagbél/végbélrák sejt, 9. sáv - MCF-7 emlőrák sejt.

A C-2-ben: 1. sáv - GOTO-P3 neuroblasztóma sejt, 2. sáv - IMR-32 neuroblasztóma sejt, 3. sáv - U-251 glióma sejt, 4. sáv - KNS42 glióma sejt, 5. sáv - KNS81 glióma sejt.

A C-3-ban: 1. sáv - NCI-H345 humán tüdőrák sejt, 2. sáv - IMR-32 neuroblasztóma sejt, 3. sáv - LNCap prosztatarák sejt, 4. sáv - PC-3 prosztatarák sejt, 5. sáv - GOTO-P3 neuroblasztóma sejt, 6. sáv - HL60 promielocitikus leukémiás sejt, 7. sáv - Bowes-mielóma sejt, 8. sáv - MCF-7 emlőrák sejt.

A 4. ábrán egy, a 2. példában végzett Western-blot eredményeit bemutató elektroforetogramm látható.

Az ábrán: 1. és 2. sáv - sejtlizátumok, 3. és 4. sáv - tenyészet felülúszók, 5. sáv - vak („mock”; csak COS-7 sejtek tenyészet felülúszója).

Az 5. ábrán az 5. példában kapott, találmány szerinti fehérjét kódoló DNS nukleotidszekvenciája, és a levezetett aminosavszekvencia látható.

A 6. ábrán egy, a 6. példában végzett Northern-blot eredményeit bemutató elektroforetogramm látható.

Az ábrán: a 9. sáv - AGS humán gyomorrák sejt, 10. sáv - PANC-1 humán hasnyálmirigy-karcinóma sejt, 11. sáv - AN3CA humán endometrióma sejt, 12. sáv - KLE humán endometrióma sejt, 13. és 14. sáv - W1353 humán kondrióma sejt, 15. sáv - SKN humán endometrióma sejt, és 16. sáv - ACHN vese-adenokarcinóma sejt.

A 7. ábrán a 14. példában egér antiszérumokban végzett antitesttiter meghatározás eredményei láthatók.

Az ábrán a ■ annak a lyuknak az abszorbanciáját mutatja, amelyhez az 1. egér antiszérumát adtuk, a □ annak, amelyhez a 2. egér antiszérumát adtuk, a ▲ annak, amelyhez a 3. egér antiszérumát adtuk, a △ annak, amelyhez a 4. egér antiszérumát adtuk, a ● annak, amelyhez az 5. egér antiszérumát adtuk, a ○ annak, amelyhez a 6. egér antiszérumát adtuk, a + annak, amelyhez a 7. egér antiszérumát adtuk, és a ◇ annak, amelyhez a 8. egér antiszérumát adtuk.

A 8. ábrán a 17. példában végzett kompetitív EIA eredményei láthatók.

Az ábrán a ■ a 39-35. számú hibridóma, a □ az 53-16. számú hibridóma, a ▲ a 61-2. számú hibridóma, a △ a 76-12. számú hibridóma, a ● a 85-16. számú hibridóma, a ○ a 112-3. számú hibridóma, a ◆ a 128-18. számú hibridóma, a ◇ a 139-26. számú hibridóma, a × a 151-2. számú hibridóma által termelt monoklonális antitestekre vonatkozó B/B₀-értékeket mutatja.

Az egyes tenyészetek hígítási faktorai a következők:

39-35.	50x;
53-16.	50x;
61-2.	120x;
76-12.	60x;
85-16.	120x;
112-3.	450x;
128-18.	450x;
139-26.	120x;
151-2.	60x;

A 9. ábrán a TGC838-fehérje és a TGC8³9~~2~~9 fehérje 24. *Sw* példa szerint elvégzett Western-blot analízisének eredményei láthatók. Az ábrán az 1., 3. és 5. sávokat a CHO-K1/TGC838N-4 tenyészet felülúszójának elektroforézisével kaptuk, a 2., 4. és 6. sávokat pedig a CHO-K1/618/839F6-3 tenyészet felülúszójának elektroforézisével kaptuk. Az 1. és 2. sávhoz a 128-18. számú antitestet (18. példa), a 3. és 4. sávhoz a 112-3. számú antitestet (18. példa), az 5. és 6. sávhoz pedig nyúl antiszérumot (19. példa) alkalmaztunk első antitestként.

A 10. ábrán a TGC838-fehérje és a TGC8³9~~2~~9-fehérje 24. *Sw* példa szerint elvégzett Western-blot analízisének eredményei láthatók. Az ábrán az 1. és 2. sávot pCAN618/H838 DNS-t tartalmazó COS7-sejtek, a 3. és 4. sávot pCAN618/H838F DNS-t tartalmazó COS7-sejtek, az 5. és 6. sávot pCAN618/H839F DNS-t tartalmazó COS7-sejtek, a 7. és 8. sávot pedig pCAN618 DNS-t tartalmazó COS7-sejtek felülúszójá-



nak elektroforézisével kaptuk. Első antitestként egér antiszérumot (12. példa) alkalmaztunk.

A 11. ábrán a TGC838-fehérje és a TGC829 fehérje 24. példa szerint elvégzett Western-blot analízisének eredményei láthatók. Az ábrán a 3. és 4. sávot pCAN618/H838F DNS-t tartalmazó COS7-sejtek, az 5. és 6. sávot pCAN618/H839F DNS-t tartalmazó COS7-sejtek, a 7. és 8. sávot pedig pCAN618 DNS-t tartalmazó COS7-sejtek felülúszójának elektroforézisével kaptuk. Első antitestként anti-FLAG egér IgG-t alkalmaztunk.

A 12. ábrán a TGC838-fehérje és a TGC839-fehérje elleni antitestek alkalmazásával a 25. példa szerint végzett immunprecipitáció eredményei láthatók.

Az ábrán az 1., 3. és 5. sáv pCAN618/H838F DNS-t tartalmazó COS7-sejtek felülúszójával, a 2., 4. és 6. sáv pedig pCAN618/H839F DNS-t tartalmazó COS7-sejtek felülúszójával készült. Az immunprecipitációt az 1. és 2. sáv esetében a 128-18. számú antitesttel (18. példa), a 3. és 4. sáv esetében nyúl antiszérummal (19. példa) végeztük; az 5. és 6. sáv kontroll (nem adtunk hozzá antitestet).

A 13. ábrán a 26. példa szerint végzett cukorlánc-hozzáadást ellenőrző teszt eredményei láthatók.

Az ábrán az 1. és 2. sávot pCAN618/H838 DNS-t tartalmazó COS7-sejtek, a 3. és 4. sávot pCAN618/H838F DNS-t tartalmazó COS7-sejtek, az 5. és 6. sávot pCAN618/H839F DNS-t tartalmazó COS7-sejtek, a 7. és 8. sávot pedig pCAN618 DNS-t tartalmazó COS7-sejtek felülúszójának elektroforézisével

kaptuk, ahol az 1., 3. és 5. sáv esetében előzőleg N-glikozidázos kezelés történt.

A 14. ábrán a 28. példában kapott és az 1. táblázatnak megfelelő munkagörbe látható.

A 15. ábrán a 28. példa szerint végzett TGC838-meghatározás eredményei láthatók.

Az ábrán a $\square$ a CHO-K1/TGC838N-4, a $\diamond$ a pCAN618/H838 DNS-t tartalmazó COS7, a $\circ$ az SW1353-1, a Δ pedig az SW1353-2 tenyészet felülúszóját jelöli.

A 16. ábrán a 28. példa szerint végzett TGC838-meghatározás eredményei láthatók.

Az ábrán a $\circ$ a egészséges alanyok, a $\diamond$ májkarcinómás betegek, a Δ pedig vastag- és végbél karcinómás betegek plazmájának TGC838-szintjét jelöli.

A 17. ábrán a 29. példában elvégzett FACS-vizsgálat eredményei láthatók.

Az ábrán a folyamatos vonal a TGC839FLAG fehérjét tartalmazó sejtcsoportot jelöli, a szaggatott vonal pedig a TGC839FLAG fehérjét nem tartalmazó sejtcsoportot.

A 18. ábrán a 29. példában elvégzett FACS-vizsgálat eredményei láthatók.

Az ábrán a +FITC-TGC839F a TGC839FLAG fehérjét tartalmazó sejtcsoportot jelöli, a -FITC-TGC839F pedig a TGC839FLAG fehérjét nem tartalmazó sejtcsoportot.

A 19. ábrán a 30. példában végzett, a TGC839-fehérje NK-sejtek citotoxicitására gyakorolt hatásai vizsgálatának eredményei láthatók. Az ábrán a $\circ$ 0 ng/ml-es, a $\square$ 50

ng/ml-es, a Δ 150 ng/ml-es, a $\diamond$ pedig 500 ng/ml-es TGC839FLAG koncentrációt jelöl.

A 20. ábrán a 31. példában végzett, a TGC839-fehérje NK-sejtek proliferációjára gyakorolt hatása vizsgálatának eredményei láthatók.

Az ábrán a $\square$ és a $\circ$ különböző egyedekből vett perifériás vérmintákat jelöl.

A 21. ábrán a 31. példában végzett, a TGC839-fehérje K562-sejtek proliferációjára gyakorolt hatása vizsgálatának eredményei láthatók.

A 22. ábrán a 31. példában végzett, a tenyészetek felülúszójából történő IFN- γ meghatározás eredményei láthatók.

Az alábbiakban ismertetjük a találmány előnyös megvalósítási módjait.

Az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciával azonos vagy lényegében azonos aminosavszekvenciát tartalmazó fehérje (a továbbiakban "a találmány szerinti fehérje"), származhat ember vagy melegvérű állatok (pl. tengerimalac, patkány, egér, csirke, nyúl, sertés, juh, szarvasmarha, majom) sejtjeiből (pl. májsejtek, lépsejtek, idegsejtek, gliasejtek, hasnyálmirigy β -sejtek, csontvelői sejtek, mezangiális sejtek, Langerhans-sejtek, epidermális sejtek, epiteliális sejtek, endoteliális sejtek, fibroblasztok, fibrociták, izomsejtek, zsírsejtek, immunsejtek [pl. makrofágok, T-sejtek, B-sejtek, természetes ölő ("killer") sejtek, hízósejtek, neutrofil sejtek, bazofil sejtek, eozinofil sejtek, monociták], megakariociták, szinoviális

sejtek, porcsejtek, csontsejtek, oszteoblasztok, oszteoklasztok, emlőmirigy-sejtek, májsejtek vagy intersticiális sejtek, vagy ezek őssejtjei, őssejtek vagy rákos sejtek}, vagy egyéb, ilyen sejteket tartalmazó szöветеiből, így agyából, vagy agyának bármely részéből (pl. bulbus olfactorius, amygdala, bazális ganglionok, hippocampus, talamusz, hipotalamusz, agykéreg, medulla oblongata, cerebellum), gerincvelőjéből, agyalapi mirigyéből, gyomrából, hasnyálmirigyéből, veséjéből, májából, ivarmirigyéből, pajzsmirigyéből, epehólyagjából, csontvelőjéből, mellékveséjéből, bőreből, izmából, tüdejéből, emésztőrendszeréből (pl. vastagbél, vékonybél), vérédből, szívéből, csecsemőmirigyéből, lépéből, állkapocsalatti mirigyéből, perifériás véréből, prosztatájából, heréjéből, petefészkéből, méhlepényéből, méhéből, csontjából, ízületeiből és vázizmaiból, vagy vérsejtjeiből vagy ezek tenyészteteiből (pl. MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01), vagy lehet szintetikus fehérje. A találmány szerinti fehérje előnyösen ember vagy melegvérű állatok (pl. tengerimalac, patkány, egér, csirke, nyúl, sertés, juh, szarvasmarha, majom) fetális sejtjeiből (különösen fetális agyi vagy tüdősejtjeiből), vagy rákos sejtjeiből származik.

Az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciával lényegében azonos találmány szerinti aminosavszekvenciák többek között azok, amelyek legalább 70%-os, előnyösen legalább 80%-os,

még előnyösebben legalább 90%-os, és még ennél is előnyösebben legalább 95%-os homológiát mutatnak az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciával.

Az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciával lényegében azonos aminosavszekvenciájú találmány szerinti fehérjék előnyösen olyan fehérjék, amelyek aminosavszekvenciája lényegében azonos az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciával és lényegében azonos aktivitású, mint az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciával rendelkező fehérje.

Konkrétabban említhetjük például azokat a fehérjéket, amelyeknek aminosavszekvenciája az 5. azonosítószámú aminosavszekvencia, és így tovább.

A lényegében azonos aktivitás lehet például sejtproliferációs aktivitás.

A "lényegében azonos aktivitás" azt jelenti, hogy a két összehasonlított fehérje (fiziológiásan vagy farmakológiai) azonos jellegű. Előnyös tehát, ha aktivitásaik, így például sejtproliferációs aktivitásaik összehasonlíthatók (pl. körülbelül 0,1-100-szoros, előnyösen körülbelül 0,1-10-szeres, még előnyösebben körülbelül 0,5-2-szeres különbség van köztük). A kvantitatív elemek, így például az említett aktivitás mértéke és a fehérje molekulásúlya azonban különbözhetnek.

A sejtproliferáció bármilyen nyilvánosan ismert eljárással meghatározható, így például a későbbiekben ismertetett szűrő eljárással.

A találmány szerinti fehérjék közé tartoznak még az úgynevezett muteinek, így például azok a fehérjék, amelyek (1) az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciából 1-5 (előnyösen 1-3) aminosav deléciójával keletkező aminosavszekvenciát tartalmaznak, (2) az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciából 1-10 [előnyösen 1-5 (még előnyösebben 1-3)] aminosav addíciójával keletkező aminosavszekvenciát tartalmaznak, (3) az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciából 1-5 (előnyösen 1-3) aminosav inszerciójával keletkező aminosavszekvenciát tartalmaznak, (4) az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciából 1-5 (előnyösen 1-3) aminosav más aminosavval történő szubsztitúciójával keletkező aminosavszekvenciát tartalmaznak, vagy (5) a fentiek egy kombinációjával keletkező aminosavszekvenciát tartalmaznak.

Azokban az esetekben, ha az aminosavszekvencia a fentiek szerint inszerciót, deléció vagy szubsztitúciót tartalmaz, nem különösebben korlátozott, hogy az inszerció(k), deléció(k) vagy szubsztitúció(k) hol helyezkednek el.

A leírásban a fehérjéket a peptidek leírásában szokásos gyakorlatnak megfelelően ismertetjük, úgy hogy baloldalon van az N-terminális (aminoterminális) és jobb oldalon van C-terminális (karboxiterminális). A találmány szerinti fehérjében, tipikusan az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciát tartalmazó fehérjében, a C-terminális általában egy karboxilcsoport ($-\text{COOH}$) vagy egy karboxilát ($-\text{COO}^-$). A C-terminális azonban lehet amid ($-\text{CONH}_2$) vagy észter ($-\text{COOR}$) is.

A fenti észterben R lehet C_{1-6} -alkilcsoport, így például metil, etil, n-propil, izopropil vagy n-butyl; C_{3-8} -cikloalkilcsoport, így például ciklopentil vagy ciklohexil, C_{6-12} -arilcsoport, így például fenil vagy α -naftil, C_{7-14} -aralkilcsoport, így például egy fenil- C_{1-2} -alkilcsoport, például benzil, vagy fenetil, vagy egy α -naftil- C_{1-2} -alkilcsoport, például α -naftilmetil, vagy pivaloil-oximetil csoport és hasonló, amelyek általában orális beadásnál alkalmazott észterekként alkalmaznak.

Azokban az esetekben, ha a találmány szerinti fehérje a C-terminálison kívül más helyen is tartalmaz karboxil- (vagy karboxilát-) csoportot vagy csoportokat, ugyancsak a találmány tárgyát képezik azok a fehérjék, amelyekben ezek a karboxilcsoportok amidáltak vagy észteresítettek. Ilyen esetben az észter lehet ugyanaz, mint a C-terminális észter.

A találmány szerinti fehérjék közé tartoznak azok is, amelyekben az N-terminális aminosavat (pl. metionint) védőcsoport (pl. C_{1-6} -acilcsoport, így például formil, vagy C_{1-6} -alkanoilcsoport, így például acetil) védi, amelyekben az *in vivo* hasítással létrejött N-terminális glutamint piroglutaminsavvá alakítottuk, amelyekben a molekulában lévő aminosav oldalláncok szubsztituensét vagy szubsztituenseit (pl. -OH, -SH, aminocsoport, imidazolcsoport, indolcsoport, guanidinocsoport) megfelelő védőcsoport (pl. C_{1-6} -acilcsoport, így például formil, vagy C_{1-6} -alkanoilcsoport, így például acetil) védi, továbbá a konjugált fehérjék, így

például az úgynevezett glikoproteinek, amelyek egy cukorlánc bekötődésével jönnek létre.

A találmány szerinti fehérjére konkrét példák többek között az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciával rendelkező humán eredetű fehérjék (1. ábra) és az 5. azonosítószámú aminosavszekvenciával rendelkező humán eredetű fehérjék (5. ábra).

A találmány szerinti fehérje jellemzője, hogy specifikusan rákos sejtekben vagy fetális agyban, fetális tüdőben vagy hasonlókban, előnyösen rákos sejtekben expresszálódik.

A találmány szerinti részpeptid, amely a fenti fehérje származéka, a fenti fehérje bármilyen részpeptid származéka lehet, amely előnyösen ugyanolyan aktivitású (pl. sejtproliferációs aktivitású), mint a találmány szerinti fenti fehérje. Alkalmazhatók például olyan peptidek, amelyek a találmány szerinti fehérje aminosavszekvenciájának legalább 20%-át, előnyösen legalább 50%-át, még előnyösebben legalább 70%-át, még ennél is előnyösebben legalább 90%-át, legelőnyösebben pedig legalább 95%-át tartalmazzák és sejtproliferációs aktivitásúak.

Ezek közül hasznosak például azok a peptidek, amelyek az 1. azonosítószámú aminosavszekvencia 22-252., 26-252. vagy 26-34. (előnyösen 26-252. vagy 26-34., és különösen előnyösen 26-34.) aminosavait magukban foglaló aminosavszekvenciát tartalmaznak, vagy amelyek az 5. azonosítószámú aminosavszekvencia 22-246., 26-246. vagy 166-190. (előnyösen 26-246. vagy 166-190., különösen előnyösen 166-190.)

aminosavait magukban foglaló aminosavszekvenciát tartalmaznak.

A találmány szerinti részpeptidben előfordulhat az aminosavszekvencia 1-5 (előnyösen 1-3) aminosavának deléciója, vagy 1-10 [előnyösen 1-5 (még előnyösebben 1-3)] aminosava addíciója az aminosavszekvenciához, vagy 1-5 (előnyösen 1-3) aminosav inszerciója az aminosavszekvenciához, vagy az aminosavszekvencia 1-5 (előnyösen 1-3) aminosavának más aminosavakkal történő szubsztitúciója.

A találmány szerinti részpeptid a C-terminálison általában karboxilcsoportot ($-\text{COOH}$) vagy karboxilátot ($-\text{COO}-$) tartalmaz, de ahogy azt már a találmány szerinti fehérjével kapcsolatban ismertettük, a C-terminális lehet amid ($-\text{CONH}_2$) vagy észter ($-\text{COOR}$) is (amelyben az R a fenti definíciónak felel meg).

A fenti találmány szerinti fehérjéhez hasonlóan a találmány szerinti részpeptidek közé tartoznak továbbá azok a peptidek is, amelyekben az N-terminális aminosavat (pl. metionint) egy védőcsoport védi, azok, amelyekben az *in vivo* hasítással létrejött N-terminális glutamint piroglutaminsavvá alakítottuk, amelyekben a molekulában lévő egyik aminosav oldallánc szubsztituensét megfelelő védőcsoport védi, továbbá a konjugált peptidek, így például az úgynevezett glikopeptidek, amelyek egy cukorlánc bekötődésével jönnek létre.

A találmány szerinti részpeptid antigénként alkalmazható antitestek előállításához, így nem minden esetben kell feltétlenül sejtproliferációs aktivitással rendelkeznie.

Ami a találmány szerinti fehérje vagy részpeptid só formáját illeti, alkalmazhatók fiziológiásan elfogadható savak (pl. szervetlen vagy szerves savak) vagy bázisok (pl. alkáli fémek) sói vagy hasonlóak, és többek között előnyösek a fiziológiásan elfogadható savaddíciós sók. Ilyen sók többek között például a szervetlen savakkal (pl. sósav, foszforsav, hidrogénbromid, kénsav) képzett sók, vagy a szerves savakkal (pl. ecetsav, hangyasav, propionsav, fumársav, maleinsav, borostyánkősav, borkősav, citromsav, almasav, oxálsav, benzoésav, metánszulfonsav, benzoeszulfonsav) képzett sók.

A találmány szerinti fehérjét és sóit nyilvánosan ismert fehérjetisztítási eljárások segítségével a fenti, emberből vagy melegvérű állatokból származó sejtekből (különösen rákos sejtekből vagy hasonlókból) vagy szövetekből (különösen fetális agyból vagy tüdőből vagy hasonlókból) állíthatjuk elő, vagy a fehérjét kódoló DNS-t tartalmazó transzformáns tenyésztésével (ld. később). Előállíthatók továbbá peptidszintézissel (ld. később) is.

Amikor humán vagy emlős szövetből vagy sejtekből (különösen rákos sejtekből, fetális agyból vagy tüdőből vagy hasonlókból) állítjuk elő, a humán vagy emlős szövetet vagy sejteket elhomogenizáljuk, például savval extraháljuk, majd az extraktumból kromatográfiás eljárások, például reverzfázisú kromatográfia és ioncserés kromatográfia alkalmazásával izoláljuk és tisztítjuk a fehérjét.

A találmány szerinti fehérje vagy részpeptid, valamint ezek só vagy amid formája szintézissel történő előállítás esetén a piacon általánosan kapható szintetikus fehérjeszintetizáló gyantát alkalmazhatunk. Ilyen gyanták például a klórmetil gyanták, a hidroximetil gyanták, a benz-hidrilamin gyanták, az aminometil gyanták, a 4-benziloxibenzil alkohol gyanták, a 4-metilbenzhidrilamin gyanták, a PAM gyanták, a 4-hidroximetil-metilfenil-acetamidometil-gyanták, a poliakrilamid gyanták, a 4-(2',4'-dimetoxifenil-hidroximetil)fenoxi gyanták, a 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminoetil)fenoxi gyanták, és hasonlóak. Ilyen gyanták alkalmazásakor megfelelően védett α -aminocsoportot és oldallánc funkciós csoportot tartalmazó aminosavakat nyilvánosan ismert kondenzálási eljárások segítségével, a kívánt fehérjének megfelelő sorrendben a gyantán összekondenzáljuk. Az utolsó reakció után a fehérjét leválasztjuk a gyantáról és egyidejűleg eltávolítjuk a különböző védőcsoportokat, majd igen híg oldatban kialakítjuk a molekulában lévő diszulfidkötéseket, aminek eredményeként megkapjuk a kívánt fehérjét vagy annak amid formáját.

A védett aminosavak fenti kondenzációja kapcsán a fehérjeszintézisben használatos különböző aktiváló reagenseket alkalmazhatunk, amelyek közül különösen előnyösek a karbodiimidek. Alkalmazható karbodiimidek például többek között a DCC, az N,N'-diizopropilkarbodiimid és az N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid. Az ezekkel történő aktiválás esetén racemizációs inhibitor adalék (pl. HOBt,

HOObt) alkalmazása mellett minden védett aminosavat közvetlenül kapcsolhatunk a gyantához, vagy előzőleg az egyes aminosavat szimmetrikus savanhidrid, vagy HOObt- vagy HOObt-észter formájában aktiválhatjuk, majd ezután kapcsoljuk a gyantához.

A védett aminosavak aktiválása vagy gyantához kondenzálása során az oldószert megfelelő módon kiválaszthatjuk a fehérjekondenzációs reakciókban használatos oldószerek közül. Alkalmazhatunk például aminosavakat, így például N,N-dimetilformaidot, N,N-dimetilacetamidot és N-metilpirrolidont, halogénezett szénhidrogéneket, így például metilén-kloridot és kloroformot, alkoholokat, így például trifluoretanolt, szulfoxidokat, így például dimetilszulfoxidot, piridint, étereket, így például dioxánt és tetrahidrofuránt, nitrileket, így például acetonitrilt és propionitrilt, észtereket, így például metil-acetátot és etil-acetátot, és ezek megfelelő keverékeit. A reakcióhőmérsékletet megfelelő módon megválaszthatjuk a fehérjekötés kialakítási reakciókhoz használatos hőmérsékletek közül, amely általában körülbelül -20°C és 50°C közötti hőmérsékletet jelent. Az egyes aktivált aminosavszármazékokat általában 1,5-4-szeres feleslegben alkalmazzuk. Ha a ninhidrinreakcióval történő vizsgálat alapján a kondenzáció nem teljes, a védőcsoportok eltávolítása nélkül megismételhetjük a kondenzációs reakciót, hogy ilyen módon teljessé váljon a kondenzáció. Ha a kondenzáció a reakció megismétlése után sem teljes, az el nem reagált aminosavakat ecetsav-

anhidrides vagy acetilimidazolos acetilálással közömbösíthetjük, hogy így a következő reakciókban ne vegyenek részt.

A kiindulási aminosavak aminocsoportjaihoz megfelelő védőcsoportok például a Z, a Boc, a t-pentiloxikarbonil, az izoborniloxikarbonil, a 4-metoxibenziloxikarbonil, a Cl-Z, a Br-Z, az adamantiloxikarbonil, a trifluoroacetil, a ftaloil, a formil, a 2-nitrofenilszulfenil, a difenilfoszfinothiol, az Fmoc és hasonló.

A karboxilcsoportok védhetők például alkil észterestéssel (pl. metil, etil, propil, butil, t-butil, ciklopentil, ciklohexil, cikloheptil, ciklooktil, 2-adamantil, vagy hasonló egyenes vagy elágazó láncú ciklikus alkilal való észterestéssel), aralkil-észterestéssel (pl. benzilészterestéssel, 4-nitrobenzil-észterestéssel, 4-metoxibenzil-észterestéssel, 4-klórbenzil-észterestéssel vagy benzhidril-észterestéssel) fenacil-észterestéssel, benziloxikarbonilhidrazid-képzéssel, t-butoxikarbonilhidrazid-képzéssel vagy tritilhidrazid képzéssel.

A szerin hidroxilcsoportja védhető például észterestéssel vagy éteresítéssel. Az észterestetéshez megfelelő csoportok például a kis szénatomszámú (C_{1-6}) alkanoilcsoportok, így például az acetil, az aroilcsoportok, így például a benzoil, és a karbonsav-eredetű csoportok, így például a benziloxikarbonil és az etoxikarbonil. Az éteresítéshez megfelelő csoportok például a benzil, a tetrahidropiránil és a t-butil.

A tirozin fenolos hidroxilcsoportjának védéséhez megfelelő csoportok például a Bzl, a Cl₂-Bzl, a 2-nitrobenzil, a Br-Z és a t-butil.

A hisztidin imidazoljának védéséhez megfelelő csoportok például a Tos, a 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzolszulfonil, a DNP, a benziloximetil, a Bum, a Boc, a Trt és az Fmoc.

A kiindulási aminosavak karboxilcsoportjainak aktivált formája lehet többek között a megfelelő savanhidrid, azid, aktivált észter [alkohollal (pl. pentaklórfenollal, 2,4,5-triklórfenollal, 2,4-dinitrofenollal, cianometilakohollal, para-nitrofenollal, HONB-vel, N-hidroxiszukcinimiddel, N-hidroxiftálimiddel, HOBt-vel) képzett észterek]. A kiindulási aminosavak aktivált formája lehet például a megfelelő foszforamid is.

Ami a védőcsoportok eltávolításához (elimináció) alkalmazható eljárást illeti, alkalmazhatunk többek között hidrogénáramban, katalizátor (pl. Pd-fekete vagy Pd-szén) jelenlétében történő katalitikus redukálást, savas kezelést például vízmentes hidrogén-fluoriddal, metánszulfonsavval, trifluor-metánszulfonsavval, trifluorecetsavval vagy ezek keverékével, lúgos kezelést például diizopropiletilaminnal, trietilaminnal, piperidinnel vagy piperazinnal, vagy nátriummal történő redukálást folyékony ammóniában. Az eliminációs reakcióhoz alkalmazható savas kezelést általában -20°C és 40°C közötti hőmérsékleten végezzük - hatásos, ha kationbefogót, így például anizolt, fenolt, tioanizolt, meta-krezolt, para-krezolt, dimetil-szulfidot, 1,4-

butánditiolt vagy 1,2-etánditiolt is adunk hozzá. A hisztidin imidazoljának védőcsoportjaként használt 2,4-dinitrofenil csoportot a fent említett 1,2-etándiol, 1,4-butándiol vagy hasonlók jelenlétében történő tiofenolos kezeléssel, vagy lúgos kezeléssel, így például híg vizes nátrium-hidroxid, híg ammónia vagy hasonlók alkalmazásával távolíthatjuk el.

Azon funkciós csoport levédéséhez, amelyeknek nem szabad részt vennie a reakcióban, az alkalmazandó védőcsoporthoz, a védőcsoport eltávolításához és azoknak a funkciós csoportoknak az aktiválásához, amelyek részt vesznek a reakcióban, többek között nyilvánosan ismert csoportokat és eljárásokat alkalmazhatunk.

Egy, fehérje amid formában történő előállításához alkalmazható másik eljárás során például először amidálással levédjük egy karboxiterminális aminosav α -karboxilcsoportját, majd az aminooldalon a kívánt hosszúságig hosszabbítjuk a peptidláncot (fehérjeláncot), végül a peptidláncból előállítunk egy olyan fehérjét, amelyben csak az N-terminális α -aminocsoport védőcsoportját távolítjuk el, és egy olyan fehérjét, amelyben csak a C-terminális karboxilcsoport védőcsoportját távolítjuk el, majd a két fehérjét egy kevert oldószerben a fentiek szerint összekondenzáljuk. A kondenzációs reakció további részletei a fent ismertettekkel azonosak. A kondenzáció eredményeként kapott védett fehérjét tisztítjuk, majd a fent említett eljárások segítségével minden védőcsoportot eltávolítunk és így jutunk a kívánt nyers fehérjetermékhez. Ezt a nyers fehér-

jét különböző ismert tisztítási eljárások segítségével megtisztíthatjuk és a fő frakciót liofilizálhatjuk, így kapjuk a kívánt fehérje amid formáját.

Ahhoz, hogy a fehérjét észter formájában állítsuk elő, a karboxiterminális aminosav α -karboxilcsoportját például egy kívánt alkohollal kondenzáljuk, és így például egy aminosavésztert kapunk, majd az amid forma előállításával azonos módon előállítjuk a kívánt észter formájú fehérjét.

A találmány szerinti részpeptidet vagy sóját bármilyen nyilvánosan ismert, peptidek szintézisére szolgáló eljárással előállíthatjuk, vagy úgy is megkaphatjuk, hogy a találmány szerinti fehérjét egy megfelelő peptidázzal elhasítjuk. A peptidek szintézisére szolgáló eljárás lehet szilárdfázisú vagy folyadékfázisú. A találmány szerinti részpeptidet vagy annak egy aminosavát tehát összekondenzáljuk a részpeptid többi részével, majd ha a kondenzációs termék védőcsoporto(ka)t tartalmaz, akkor az(oka)t eltávolítjuk, és így kapjuk a kívánt fehérjét. A kondenzáláshoz és a védőcsoportok eltávolításához alkalmazható nyilvánosan ismert eljárások tekintetében ld. például az alábbi publikációkat:

(1) M. Bodansky és M.A. Ondetti, "Peptide Synthesis", Interscience Publishers, New York, 1966;

(2) Scroeder és Luebke, "The Peptide", Academic Press, New York (1965);

(3) Nobou Izumiya és mtsai., "Peputido Gosei no Kiso to Jikken" (Peptide Synthesis, Fundamentals and Experiments), Maruzen (1975);

(4) Haruaki Yajima és Shumpei Sakakibara, "Seikagaku Jikken Koza" (Lectures in Biochemistry) 1., "Tampakushitsu no Kagaku IV." (Chemistry of Proteins), 205 (1977);

(5) Haruaki Yajima (szerk.), "Zoku Iyakuhi no Kaihatsu" (Development of Drugs, 2nd series), 14. kötet, "Peptide Synthesis", Hirokawa Shoten.

A reakciók befejezése után a találmány szerinti részpeptidet például az alábbi eljárások egy megfelelő kombinációjával tisztíthatjuk és izolálhatjuk: oldószeres extrakció, desztillálás, oszlopkromatográfia, folyadék-kromatográfia, átkristályosítás és így tovább. Amennyiben a fenti eljárásokkal előállított részpeptid szabad formában keletkezik, nyilvánosan ismert eljárások vagy azok módosított változatai segítségével megfelelő sóvá alakíthatjuk. Ha fordított esetben só formában keletkezik, a sót nyilvánosan ismert eljárások vagy azok módosított változatai segítségével szabad formává vagy másik sóvá alakíthatjuk.

A találmány szerinti fehérjét kódoló DNS bármilyen lehet, feltéve, hogy a fenti találmány szerinti fehérjét kódoló nukleotidszekvenciát tartalmaz. Lehet genomiális DNS, genomiális DNS-könyvtár, a fenti sejtek vagy szövetek bármelyikéből előállított cDNS, vagy szintetikus DNS.

A könyvtár előállításához alkalmazott vektor bármilyen lehet, így például lehet bakteriofág, plazmid, kozmid vagy fágmid. A fenti sejtekből vagy szövetekből előállított

teljes RNS vagy mRNS frakció alkalmazásával lehetőség van közvetlen, reverz transzkriptáz polimeráz-láncreakcióval történő amplifikálásra (a továbbiakban röviden "RT-PCR") is.

A találmány szerinti fehérjét kódoló DNS lehet például (1) 2. azonosítószámú nukleotidszekvenciát tartalmazó DNS, vagy erősen sztringens körülmények között a 2. azonosítószámú nukleotidszekvenciával hibridizálni képes nukleotidszekvenciát tartalmazó, és a találmány szerinti fehérje aktivitásával lényegében azonos aktivitású (pl. sejtproliferációs aktivitású) fehérjét kódoló DNS, (2) 6. azonosítószámú nukleotidszekvenciát tartalmazó DNS, vagy erősen sztringens körülmények között a 6. azonosítószámú nukleotidszekvenciával hibridizálni képes nukleotidszekvenciát tartalmazó, és a találmány szerinti fehérje aktivitásával lényegében azonos aktivitású (pl. sejtproliferációs aktivitású) fehérjét kódoló DNS, továbbá bármilyen más ehhez hasonló DNS.

Az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciájú fehérjét kódoló DNS közelebbről lehet például többek között olyan DNS, amelynek nukleotidszekvenciája azonos a 2. azonosítószámú nukleotidszekvenciával, az 5. azonosítószámú aminosavszekvenciájú fehérjét kódoló DNS közelebbről lehet például többek között olyan DNS, amelynek nukleotidszekvenciája azonos a 6. azonosítószámú nukleotidszekvenciával.

A találmány szerinti részpeptidet kódoló DNS bármilyen lehet, feltéve hogy a fenti találmány szerinti részpeptidet kódoló nukleotidszekvenciát tartalmaz. Lehet genomiális DNS, genomiális DNS-könyvtár, a fenti sejtek vagy szövetek bármelyikéből előállított cDNS, vagy szintetikus DNS.

A találmány szerinti részpeptidet kódoló DNS lehet például (1) 2. azonosítószámú nukleotidszekvencia egy részletét tartalmazó DNS, vagy erősen sztringens körülmények között a 2. azonosítószámú nukleotidszekvenciával hibridizálni képes nukleotidszekvenciát tartalmazó, és a találmány szerinti fehérje aktivitásával lényegében azonos aktivitású fehérjét kódoló DNS egy részletét tartalmazó DNS, (2) 6. azonosítószámú nukleotidszekvencia egy részletét tartalmazó DNS, vagy erősen sztringens körülmények között a 6. azonosítószámú nukleotidszekvenciával hibridizálni képes nukleotidszekvenciát tartalmazó, és a találmány szerinti fehérje aktivitásával lényegében azonos aktivitású (pl. sejtproliferációs aktivitású) fehérjét kódoló DNS egy részletét tartalmazó DNS, továbbá bármilyen más ehhez hasonló DNS.

A találmány szerinti fehérjét vagy részpeptidet teljes egészében kódoló DNS klónozására (a továbbiakban a fehérjét vagy hasonlót kódoló DNS klónozásának és expresszál-tatásának ismertetésében a fehérjét vagy hasonlót néhol röviden csak a "találmány szerinti fehérje" néven említjük) szolgáló eljárások során nyilvánosan ismert PCR-eljárást alkalmazhatunk, amelyben a találmány szerinti fehérje meg-

felelő részleges nukleotidszekvenciáit tartalmazó szintetikus DNS-láncindítókat alkalmazunk, vagy egy, a találmány szerinti fehérjét teljes egészében vagy részben kódoló DNS-fragmens vagy szintetikus DNS jelölt formájához való hibridizáltatással kiválogathatjuk a megfelelő vektorba beépült DNS-eket. A hibridizáltatás történhet például az alábbi publikációban ismertetett eljárással: "Molecular Cloning", 2. kiadás [J. Sambrook és mtsai., Cold Spring Harbor Lab. Press, (1989)]. Amennyiben kereskedelmi forgalomban kapható könyvtárat használunk, követhetjük a gyártói utasításban megadott procedúrát.

Egy DNS nukleotidszekvenciája módosítható például a lyukas ("gapped") duplex eljárással, vagy a Kunkel-féle eljárással, vagy hasonló nyilvánosan ismert eljárással, vagy ezek valamilyen módosított változatával, nyilvánosan ismert reagenskészletek, például a MutanTM-G (Takara Shuzo) vagy a MutanTM-K (Takara Shuzo) alkalmazásával.

A klónozott fehérjekódoló DNS alkalmazható önmagában, vagy ha kívánatos, például restrikciós enzimekkel való emésztés vagy egy kapcsoló hozzákötése után. A DNS az 5'-végen transzlációiniciációs kodonként ATG-t tartalmaz, a 3'-végen pedig transzlációterminációs kodonként tartalmazhat TAA-t, TGA-t vagy TAG-t. A transzlációiniciációs és/vagy transzlációterminációs kodonokat megfelelő szintetikus DNS-adapterek segítségével is hozzákapcsolhatjuk a DNS-hez.

A találmány szerinti fehérjéhez expressziós vektort előállíthatunk például az alábbiak szerint: (a) egy, a találmány szerinti fehérjét kódoló DNS-ből kivágjuk a kívánt DNS-fragmenst és (b) a DNS-fragmenst beültetjük egy megfelelő expressziós vektorba, mégpedig az abban lévő promótértől 3'-irányban.

Alkalmazható vektorok például az *Escherichia coli*-ból származó plazmidok (pl. pBR322, pBR325, pUC12, pUC13) a *Bacillus subtilis*-ból származó plazmidok (pl. pUB110, pTP5, pC194), az élesztőből származó plazmidok (pl. pSH19, pSH15), a bakteriofágok, így például a λ -fág, a retrovírusok, a vakcinia-vírusok, a bakulovírusok és más állati vírusok, továbbá a pAl-11, a pXT-1, a pRc/CMV, a pRc/RSV, a pcDNAI/Neo és így tovább.

A találmány megvalósítása során alkalmazott promóter bármilyen promóter lehet, feltéve hogy megfelelő a génexpresszióhoz használt gazdához. Állati sejtekhez alkalmazható promóterek például többek között az SR α promóter, az SV40 korai promóter, az HIV LTR promóter, a CMV promóter, a HSV-TSK promóter.

Ezek közül előnyösek a CMV (citomegalovírus) promóter, az SR α promóter és hasonlók. Amennyiben a gazda *Escherichia*, előnyös a trp promóter, a lac promóter, a recA promóter, a λ PL promóter, az lpp promóter, a T7 promóter és hasonlók. Amennyiben a gazda *Bacillus*, előnyös az SPO1 promóter, az SPO2 promóter, a penP promóter és hasonlók. Amennyiben a gazda élesztő, előnyös a PHO5 promóter, a PGK promóter, a GAP promóter, az ADH promóter és hasonlók.

Amennyiben a gazda rovarsejt, előnyös a polihedrin promóter, a P10 promóter és hasonlók.

A fentiek mellett, ha kívánatos, expressziós vektor-ként alkalmazhatók még azok is, amelyek enhanszert, splice-szignált, poli(A)-addíciós szignált, szelekciós markert, SV40 replikációs origót (a továbbiakban néhol "SV40ori") vagy hasonlót tartalmaznak. Szelekciós markerként alkalmazható például a dihidrofolát-reduktáz (a továbbiakban néhol "dhfr") génje [metotrexát (MTX) rezisztencia gén], az ampicillinrezisztencia génje (a továbbiakban néhol "Amp^r"), a neomicinrezisztencia génje (a továbbiakban néhol "Neo^r" vagy "G418-rezisztencia") és hasonlók. Különösen abban az esetben, ha szelekciós markerként a dhfr-gént alkalmazzuk dhfr-gén hiányos kínai hörcsög sejtekben, a rekombináns sejteket timidinmentes tápközegen is szelektálhatjuk.

Ahol szükséges továbbá, a találmány szerinti fehérje N-terminális végére egy, a gazdának megfelelő szignálszekvencia is kapcsolható. Amennyiben a gazda *Escherichia*, alkalmazható a PhoA szignálszekvencia, az OmpA szignálszekvencia vagy hasonlók. Amennyiben a gazda *Bacillus*, alkalmazható az α -amiláz szignálszekvencia, a szubtilizin szignálszekvencia vagy hasonlók. Amennyiben a gazda élesztő, alkalmazható az MF α szignálszekvencia, a SUC2 szignálszekvencia vagy hasonlók. Amennyiben a gazda állati sejt, alkalmazható az inzulin szignálszekvencia, az α -interferon szignálszekvencia, az antitestmolekula szignálszekvencia vagy hasonlók.

Az így összeszerelt és a találmány szerinti fehérjét kódoló DNS-t tartalmazó vektor alkalmazásával előállíthatunk egy transzformánst.

Gazdaként alkalmazhatók például *Escherichia*, *Bacillus*, élesztők, rovarsejtek, rovarok, állati sejtek és így tovább.

Az *Escherichia*-ra konkrét példák az *Escherichia coli* K12 DH1 [Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 60, 160 (1968)], JM103 [Nucleic Acids Research 9, 309 (1981)], JA332 [Journal of Molecular Biology 120, 517 (1978)], HB101 [Journal of Molecular Biology 41, 459 (1969)], C600 [Genetics 39, 440 (1954)] és így tovább.

Alkalmazható *Bacillus*-ok például a *Bacillus subtilis* MI114 [Gene 24, 255 (1983)] és 207-21 [Journal of Biochemistry 95, 87 (1984)].

Alkalmazható élesztők például a *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, a *Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913, NCYC2036, a *Pichia pastoris* KM71 és hasonlóak.

Alkalmazható rovarsejtek például a „cabbage armyworm” (*Spodoptera frugiperda*, „káposzta-gyombagoly”) lárvából származó állandósult sejtvonalak (Sf-sejtek), a *Trichoplusia ni* mezenteronjából származó MG1-sejtek, a *Trichoplusia ni* petéjéből származó High Five TM sejtek, a *Mamestra brassicae*-ből származó sejtek, az *Estigmента acreá*-ból származó sejtek és hasonlóak, amikor a vírus AcNPV, a selyemhernyóból származó állandósult sejtvonalak

(*Bombyx mori*, N-sejtek; BmN-sejtek). Az Sf-sejtek közül alkalmazhatók például többek között az Sf9-sejtek (ATCC CRL 1711) és az Sf21 sejtek [mindkettő esetében ld. Vaughn, J.L. és mtsai., *In Vivo* 13, 213-217 (1977)].

Alkalmazható rovarok például a selyemhernyólárvák és hasonlóak [Maeda és mtsai., *Nature* 315, 592 (1985)].

Alkalmazható állati sejtek például a majom COS-7 sejtek, a Vero-sejtek, a kínai hörcsög CHO-sejtek (a továbbiakban röviden CHO-sejtek), a dhfr-gén hiányos kínai hörcsög CHO-sejtek [a továbbiakban röviden CHO(dhfr⁻) sejtek], az egér L-sejtek, az egér AtT-20 sejtek, az egér mielómasejtek, a patkány GH3-sejtek és a humán FL-sejtek. Alkalmazhatók továbbá különböző normál humán sejtek, így például májsejtek, lépsejtek, idegsejtek, gliasejtek, hasnyálmirigy β -sejtek, csontvelői sejtek, mezangiális sejtek, Langerhans-sejtek, epidermális sejtek, epiteliális sejtek, endoteliális sejtek, fibroblasztok, fibrociták, izomsejtek, zsírsejtek, immunsejtek [pl. makrofágok, T-sejtek, B-sejtek, természetes ölő ("killer") sejtek, hízósejtek, neutrofil sejtek, bazofil sejtek, eozinofil sejtek, monociták], megakariociták, szinoviális sejtek, porcsejtek, csontsejtek, oszteoblasztok, oszteoklasztok, emlőmirigy-sejtek, májsejtek vagy interszticiális sejtek, vagy ezek prekursor sejtjei, őssejtek vagy rákos sejtek is.

Az *Escherichia* transzformálása történhet például az alábbi publikációkban ismertetett eljárásokkal: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110 (1972), vagy *Gene* 17, 107 (1982).

A *Bacillus* transzformálása történhet például az alábbi publikációban ismertetett eljárással: Molecular & General Genetics 168, 111 (1979).

Az élesztő transzformálása történhet például az alábbi publikációkban ismertetett eljárásokkal: Methods in Enzymology 194, 182-187 (1991) vagy Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 (1978).

A rovarsejtek transzformálása történhet például az alábbi publikációban ismertetett eljárással: Bio/Technology 6, 47-55 (1988).

Az állati sejtek transzformálása történhet például az alábbi publikációkban ismertetett eljárásokkal: Saibo Kogaku Bessatsu (Cell Engineering, Extra Number) 8, Shin Saibo Kogaku Jikken Purotokoru (Protocols for Cell Engineering, Revised) 263-267 (1995) (kiadó: Shujansha) vagy Virology 52, 456 (1973).

Ilyen módon előállíthatunk egy olyan transzformánst, amelyet egy fehérjekódoló DNS-t tartalmazó expressziós vektorral transzformáltunk.

Az *Escherichia* vagy a *Bacillus* nemzetségbe tartozó transzformánsok szaporításakor tenyésztő tápközegként folyékony tápközeget alkalmazunk, amely tartalmaz szénforrás(oka)t, nitrogénforrás(oka)t, szervesetlen anyago(ka)t és így tovább. A szénforrás lehet például többek között glükóz, dextrin, oldható keményítő és szacharóz; a nitrogénforrások lehetnek például többek között ammóniumsók, nitrátsók, kukorica-áztatólé, pepton, kazein, húskivonat, szójapogácsa, burgonyakivonat és hasonló szervesetlen és

szerves anyagok; a szervetlen anyag lehetnek például többek között kálium-klorid, nátrium-dihidrogén-foszfát és magnézium-klorid. A tápközeghez hozzáadhatunk továbbá élesztőkiwonatot, vitaminokat és/vagy növekedés elősegítő faktorokat. A tápközeg pH-ja előnyösen körülbelül 5 és 8 közötti.

Escherichia tenyésztéséhez előnyös tápközeg például a glükózt és kazaminosavakat tartalmazó M9-tápközeg [Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)]. A promóterek hatékony működése érdekében szükség esetén olyan szereket is adhatunk a tápközeghez, mint például a 3β -indolil-akrilsav.

Amennyiben a gazda *Escherichia*, a szaporítást általában körülbelül 15°C és 43°C közötti hőmérsékleten, körülbelül 3-24 órán át végezzük. Szükség esetén a tenyészetet levegőztethetjük és/vagy rázathatjuk is.

Amennyiben a gazda *Bacillus*, a tenyésztést általában körülbelül 30°C és 40°C közötti hőmérsékleten, körülbelül 6-24 órán át végezzük. Szükség esetén a tenyészetet levegőztethetjük és/vagy rázathatjuk is.

Élesztő transzformáns tenyésztése esetén a tápközeg lehet például Burkholder-féle minimális tápközeg [Bostian, K.L. és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4505 (1980)] vagy 0,5% kazaminosavat tartalmazó SD-tápközeg [Bitter, G.A. és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5330 (1984)]. A tápközeg pH-ja előnyösen körülbelül 5 és 8 közötti. A tenyésztést általában körülbelül 20°C és 35°C közötti hőmérsékleten, körülbelül 24-72 órán át végezzük.

Szükség esetén a tenyészetet levegőztethetjük és/vagy rázathatjuk is.

Rovarsejt vagy rovar eredetű transzformáns gazda szaporítása esetén tápközegként például 10% inaktivált szarvasmarha szérumot tartalmazó Grace-féle tápközeg [Grace, T.C.C., Nature 195, 788 (1962)] alkalmazható. A tápközeg pH-ját előnyösen körülbelül 6,2 és 6,4 közötti értékre kell beállítani. A tenyésztést általában körülbelül 27°C hőmérsékleten, körülbelül 3-5 napon át végezzük. Szükség esetén a tenyészetet levegőztethetjük és/vagy rázathatjuk is.

Állati sejt transzformáns gazdák szaporítása esetén tápközegként például MEM-tápközeget [Science 122, 501 (1952)], DMEM-tápközeget [Virology 8, 396 (1959)], RPMI 1640 tápközeget [The Journal of the American Medical Association 199, 519 (1967)], 199-tápközeget [Proceedings of the Society for the Biological Medicine 73, 1 (1950)], amelyek mindegyikét 5-20% fetális borjúsérummal kell kiegészíteni. A pH előnyösen körülbelül 6 és 8 közötti. A tenyésztést általában körülbelül 30°C és 40°C közötti hőmérsékleten, körülbelül 15-60 órán át végezzük. Szükség esetén a tenyészetet levegőztethetjük és/vagy rázathatjuk is.

Ilyen módon a transzformánst rábírhatjuk arra, hogy extracellulárisan termelje a találmány szerinti fehérjét.

A találmány szerinti fehérjét például az alábbiak szerint választhatjuk el és tisztíthatjuk meg a tápközegből.

A találmány szerinti fehérje baktériumsejtek vagy egyéb sejtek tenyészetéből történő kivonására szolgáló megfelelő eljárás során például egy nyilvánosan ismert eljárással történő tenyésztés után learatjuk a baktériumsejteket vagy egyéb sejteket, megfelelő pufferben felfuszpendáljuk őket, majd például szonikálással, lizozimes kezeléssel vagy fagyasztással és kiolvasztással elroncsoljuk őket, és végül centrifugálással vagy filtrálással kinyerjük a fehérjét tartalmazó nyers kivonatot. A puffer tartalmazhat fehérjedenaturáló szert, így például ureát vagy guanidinhidrokloridot, továbbá felületaktív szert, így például Triton-X-100TM-at is. Ha a fehérje a tenyészet felülúszójába szekretálódik, akkor a tenyésztést követően a tenyészetet szétválasztjuk a baktériumsejtekre vagy egyéb sejtekre és a tenyészet felülúszójára, és összegyűjtjük a felülúszót.

Az így kapott tenyészet felülúszóban vagy kivonatban lévő fehérjét nyilvánosan ismert elválasztási/tisztítási eljárások egy megfelelő kombinációjával tisztíthatjuk meg. Ilyen ismert eljárások például többek között az oldékony-ságbeli különbségeken alapuló technológiák, mint például a kisózás és az oldószeres kicsapás, a főként molekulasúlybeli különbségeken alapuló technológiák, mint például a dialízis, az ultrafiltrálás, a gélfiltrálás és az SDS-poliakrilamid-gélelektroforézis, a töltésbeli különbségeken alapuló technológiák, mint például az ioncserés kromatográfia, a specifikus affinitásokon alapuló technológiák, mint például az affinitáskromatográfia, a hidrofobicitásbeli különbségeken alapuló technológiák, mint például a

reverzfázisú nagyteljesítményű folyadékkromatográfia, és az izoelektromos pontbeli különbségeken alapuló technológiák, mint például az izoelektromos fókuszálás.

Amennyiben az így kapott fehérje szabad formában van jelen, nyilvánosan ismert eljárások vagy azok módosított változatai segítségével sóvá alakíthatjuk. Ha pedig a fehérje só formájában van jelen, nyilvánosan ismert eljárások vagy azok módosított változatai segítségével szabad formává alakíthatjuk.

Lehetőség van továbbá arra is, hogy egy megfelelő fehérjemódosító enzim segítségével a transzformáns által termelt fehérjét, vagy a már megtisztított fehérjét mesterségesen módosítsuk, vagy abból egy polipeptid részletet deletáljunk. Fehérjemódosító enzimként alkalmazhatunk például tripszint, kimotripszint, arginin-endoropeptidázt, pro-teín-kinázt és glikozidázt.

Az így kapott fehérje vagy sója jelenlétét vagy aktivitását például úgy határozhatjuk meg, hogy vizsgálhatjuk egy jelölt ligandhoz való kötődését vagy specifikus antitestek alkalmazásával immuntesztet végzünk.

A találmány szerinti fehérjére vagy részpeptidre, vagy ezek sójára specifikus antitestek lehetnek poliklonális vagy monoklonális antitestek, feltéve hogy felismerik a találmány szerinti fehérjét vagy részpeptidet, vagy ezek sóját.

A találmány szerinti részpeptidre vagy sójára specifikus antitest előnyösen például olyan antitest, amely (1) specifikus az 1. azonosítószámú aminosavszekvencia 22-252.,

26-252. vagy 26-34. (előnyösen 26-252. vagy 26-34., még előnyösebben 26-34.) aminosavait tartalmazó szekvenciával rendelkező részpeptidre vagy sójára és (2) specifikus az 5. azonosítószámú aminosavszekvencia 22-246., 26-246. vagy 166-190. (előnyösen 26-246. vagy 166-190., még előnyösebben 166-190.) aminosavait tartalmazó szekvenciával rendelkező részpeptidre vagy sójára.

A találmány szerinti fehérjére vagy részpeptidre, vagy ezek sójára (az antitestek leírásánál a továbbiakban a fehérjét vagy hasonlókat néhol egyszerűen a "találmány szerinti fehérje" néven említjük) specifikus antitestet nyilvánosan ismert antitest vagy antiszérum előállítási eljárások segítségével állíthatjuk elő, amelyhez antigénként a találmány szerinti fehérjét alkalmazzuk.

(a) Monoklonális antitestet termelő sejtek előállítása

A találmány szerinti fehérje önmagában vagy hordozóval vagy hígítószerrel együtt beadjuk egy melegvérű állatnak, méghozzá olyan helyen, hogy így az állat a beadás után antitesteket tudjon termelni. A beadás során az antitest-termelés fokozása érdekében alkalmazhatunk komplett vagy inkomplett Freund-féle adjuvánst is. A beadás általában 2-6 hetente egyszer, és összességében mintegy 2-10 alkalommal történik. Ilyen célra alkalmazható melegvérű állat például többek között a majom, a nyúl, a kutya, a tengerimalac, az egér, a patkány, a juh, a kecske, a csirke, amelyek közül előnyösek az egér és a patkány.

A monoklonális antitesttermelő sejtek előállítása során az antigénnel immunizált melegvérű állatok (pl. egerek) közül kiválasztjuk azt az egyedet, amelyben az antitest-titer mérhető, majd az utolsó immunizálás után 2-5 nappal kivágjuk a lépét vagy a nyirokcsomót és az abban lévő antitesttermelő sejteket ugyanabból a fajból vagy más fajból származó mielómasejtekkel fuzionáltatjuk, így monoklonális antitesttermelő hibridómákat kapunk. Egy antiszérum-minta antitesttiterét például úgy határozhatjuk meg, hogy az antiszérumot a jelölt fehérjével (ld. később) reagáltatjuk és megmérjük az antitesthez kötött jelölés aktivitását. A fuzionáltatást történhet például a Koehler és Milstein [Nature 256, 495 (1975)] által ismertetett eljárással. Fúziós promóterként alkalmazhatunk például polietilén-glikolt (PEG) és Sendai-vírust, amelyek közül a PEG előnyös.

Mielómasejtként alkalmazhatunk például melegvérű állatokból származó mielómasejteket, így például az NS-1-et, a p3U1-et, az SP2/0-t és az AP-1-et, amelyek közül a P3U1 az előnyös. Az antitesttermelő sejtek (lépsejtek) és a mielómasejtek számának aránya előnyösen körülbelül 1:1 és 20:1 közötti, a PEG-et (amely előnyösen PEG 1000 és PEG 6000 közötti) körülbelül 10-80%-os koncentrációban adjuk hozzájuk. A sejtfuzionáltatást hatékonyan úgy végezhetjük, hogy az inkubálás 20-40°C-on, előnyösen 30-37°C-on, 1-10 percig történik.

A monoklonális antitesttermelő hibridómákat különböző eljárásokkal szűrhetjük. Ilyen eljárás például az, amelynek során a hibridómatenyészet felülúszóját felvisszük egy szí-

lárd fázisra (pl. mikrolemezre), amelyhez előzőleg közvetlenül vagy hordozóval együtt egy fehérjeantigént kötöttünk ki, majd hozzáadunk egy radioaktívan jelölt vagy enzimmel jelölt anti-immunglobulin antitestet (ha a sejtfúzióhoz használt sejtek egér sejtek, akkor anti-egér immunglobulin antitestet), vagy protein-A-t, majd detektáljuk a szilárd fázishoz kötött monoklonális antitestet. Ilyen eljárás továbbá az is, amelynek során a hibridómatenyészet felülúszóját felvisszük egy szilárd fázisra, amelyhez előzőleg anti-immunglobulin antitestet vagy protein-A-t kötöttünk ki, majd hozzáadunk egy radioaktívan jelölt vagy enzimmel jelölt fehérjét és detektáljuk a szilárd fázishoz kötött monoklonális antitestet.

A monoklonális antitestek kiválogatása nyilvánosan ismert eljárások vagy azok módosított változatai segítségével történhet. Általában úgy végezzük, hogy HAT-ot (hipoxantint, aminopterint és timidint) tartalmazó, állati sejtek szaporítására alkalmas tápközeget alkalmazunk. A kiválogatáshoz és szaporításhoz alkalmazott tápközegek bármilyen lehet, feltéve hogy a hibridóma növekedni tud rajta. Alkalmazható például 1-20%, előnyösen 10-20% fetális borjúsérummal kiegészített PRMI 1640 tápközegek, 1-10% fetális borjúsérummal kiegészített GIT tápközegek (Wako Pure Chemical Ind.), vagy sérummentes hibridómatenyésztő tápközegek (SFM-101, Nissui Pharmaceutical) és hasonlóak. A tenyésztési hőmérséklet általában 20-40°C, előnyösen 37°C. A tenyésztési idő általában 5-21 nap, előnyösen 1-2 hét. A tenyésztést általában 5% szén-dioxid jelenlétében végezzük.

A hibridómatenyészet felülúszójának antitesttiterét ugyanolyan módon határozhatjuk meg, mint az antiszérumok antitesttiterét (ld. fent).

(b) A monoklonális antitestek tisztítása

A monoklonális antitestek elválasztása és tisztítása nyilvánosan ismert eljárások segítségével történhet, például egy immunglobulinok tisztítására alkalmas eljárással [pl. kisózás, alkoholos kicsapás, izoelektromos kicsapás, elektroforézis, ioncserélővel (pl. DEAE-vel) történő adszorpció/deszorpció, ultracentrifugálás, gélfiltrálás, specifikus tisztítási eljárások, amelyek során egy antigénhez kötött szilárd fázison vagy egy aktív adszorbensen, például protein-A-n vagy protein-G-n csak az antitestet kötjük ki, majd a kötés disszociálásával kinyerjük az antitestet].

Poliklonális antitestek előállítása

A találmány szerinti poliklonális antitestet nyilvánosan ismert eljárások vagy azok módosított változatai segítségével állíthatjuk elő; például úgy, hogy egy melegvérű állatot csak az immunogénnel (fehérjeantigénnel) vagy annak konjugált formájával és egy hordozóval immunizálunk ugyanolyan módon, mint amikor monoklonális antitesteket állítunk elő (ld. fent), majd az immunizált állatból összegyűjtjük a találmány szerinti fehérjére specifikus antitestet tartalmazó anyagot, végül elválasztjuk és megtisztítjuk a fehérjét.

A melegvérű állatok immunizálásához alkalmazott immunogén-fehérjehordozó konjugátum tekintetében elmondható, hogy bár a hordozófehérje típusa, valamint a hordozó és

a haptén keverési aránya nem kritikus tényező, feltéve hogy hatékonyan tud termelődni a hordozóval keresztkötött és az immunizáláshoz használt hapténra specifikus antitest, a hapténhez szarvasmarha szérumalbumint, szarvasmarha tiroglobulint, hemocianint vagy hasonlót kapcsoltunk 0,1:1 és 20:1 közötti, előnyösen 1:1 és 5:1 közötti súlyarányban.

A haptén hordozóhoz kapcsolása tekintetében különböző kondenzálószerrek alkalmazhatók, így például glutáraldehid, karbodiimidek, aktív maelimidészterek és tiol vagy ditiopridil tartalmú aktív észter reagensek.

A kapcsolási terméket önmagában vagy hordozóval vagy hígítószerrel együtt adjuk be egy melegvérű állatnak, még-hozzá olyan helyen, hogy így az állat a beadás után antitesteket tudjon termelni. A beadás során az antitesttermelés fokozása érdekében alkalmazhatunk komplett vagy inkomplett Freund-féle adjuvánst is. A beadás általában 2-6 hetente egyszer, és összességében mintegy 3-10 alkalommal történik.

A poliklonális antitest kinyerhető a fenti eljárással immunizált melegvérű állat véréből, aszciteszfolyadékából és így tovább, előnyösen véréből.

Az antiszérum poliklonális antitesttiterét az antiszérum antitesttiterének meghatározásánál ismertetettel azonos módon határozhatjuk meg. A poliklonális antitestet a monoklonális antitestek elválasztásánál és tisztításánál ismertetettel azonos immunglobulin elválasztási és tisztítási eljárással választhatjuk el és tisztíthatjuk meg.

Az alábbiakban ismertetjük a találmány szerinti fehérje vagy részpeptid, vagy ezek sója (a továbbiakban néhol röviden a "találmány szerinti fehérje"), valamint a találmány szerinti fehérjére vagy részpeptidre, vagy ezek sójára specifikus antitest (a továbbiakban néhol a "találmány szerinti antitest") alkalmazását.

(1) A találmány szerinti fehérjét vagy hasonlókat tartalmazó terápiás és/vagy megelőző készítmény különböző betegségekhez

A találmány szerinti fehérje vagy hasonlók sejtproliferációs aktivitásúak, így gyógyhatású anyagként alkalmazhatók, így például szövetregeneráló szerként egy beteg szövetrész (teljes vagy részleges, de előnyösen részleges) kivágása után.

A találmány szerinti fehérje vagy hasonlók kezelésre vagy megelőzésre szolgáló fenti készítményben való alkalmazásakor előnyösen a fehérjét legalább 90%-os, előnyösen legalább 95%-os, még előnyösebben legalább 98%-os és még ennél is előnyösebben legalább 99%-os tisztaságban alkalmazzuk.

A találmány szerinti fehérje vagy hasonlók alkalmazhatók orálisan tabletták (szükség esetén cukorbevonatú tabletták), kapszulák, elixírek, mikrokapszulák és így tovább, formájában, vagy nem orálisan, parenterális oldatok, így például vízben vagy más gyógyászatilag elfogadható folyadékban készített aszeptikus oldatok, vagy szuszpenziók formájában. A készítmény előállítható például úgy, hogy a találmány szerinti fehérjéhez vagy hasonlókhöz többek között

egy fiziológiásan elfogadható hordozót, ízesítőszert, kötőanyagot, hordozót, tartósítószert, stabilizátort és/vagy megkötőt keverünk, és ilyen módon a gyógyszerészeti gyakorlatban általánosan szükséges egységdózis formákat kapunk. A fenti gyógyászati készítményekben az aktív hatóanyag mennyiségének elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy a jelzett tartományon belüli megfelelő dózist biztosítsa.

A például tablettákba vagy kapszulákba formulázható adalékok többek között a következők: megkötők, így például zselatin, kukoricakeményítő, tragantmézga vagy gumiarábi-kum; kötőanyagok, így például kristályos cellulóz; duzzasztószerek, így például kukoricakeményítő, zselatin és alginasav; síkosítók, így például magnézium-sztearát; édesítőszerek, így például szacharóz, laktóz és szacharin; valamint ízesítőanyagok, így például borsmenta, fajdbogyó olaj és cseresznye. Ha az egységkészítmény kapszula, akkor a fenti típusú anyagokon kívül tartalmazhat még folyékony hordozót, így például egy olajat vagy zsírt. A steril injekciós készítményeket például úgy állíthatjuk elő, hogy az aktív hatóanyagot egy hordozóban, például injekciós vízben, vagy természetes növényi olajban, így például szezámolajban vagy kókuszolajban, és így tovább a szokásos gyógyszerészeti gyakorlatnak megfelelően, feloldjuk vagy felfuszpendáljuk.

A vizes injekciós oldatok közé tartoznak például a fiziológiás sóoldat, a glükózt és/vagy egyéb segédszereket (pl. D-szorbitolt, D-mannitolt, nátrium-kloridot) tartalmazó izotóniás oldatok, és hasonlóak. Alkalmazhatók bennük

megfelelő oldódási segédanyagok, így például alkohol (pl. etanol), polialkohol (pl. propilénglikol, polietilén-glikol), vagy nemionos felületaktív anyag (pl. poliszorbát 80TM, HCO-50). Olajos folyadékként alkalmazható például szezámolaj, szójaolaj és hasonló, amelyekhez oldódási segédanyagként adhatunk még benzil-benzoátot, benzil-alkoholt vagy hasonlókat is. Adhatunk hozzá továbbá puffert (pl. foszfátpuffert, nátrium-acetát puffert), fájdalomcsillapítót (pl. benzalkónium-kloridot, prokain-hidrokloridot), stabilizátort (pl. humán szérumalbumint, poli-etilén-glikolt), tartósítószeret (pl. benzil-alkoholt, fenolt) és/vagy antioxidánst is. Az előállított parenterális oldatokat általában megfelelő ampullákba töltjük.

Az így kapott készítmények biztonságosak és alacsony toxicitásúak, és beadhatók például embernek és melegvérű állatoknak (pl. patkányoknak, egereknek, tengerimalacoknak, nyulaknak, madaraknak, juhoknak, sertéseknek, szarvasmarháknak, lovaknak, macskáknak, kutya-knak, majmoknak).

A találmány szerinti fehérje vagy hasonló dózisa a kezelendő betegségtől és a beadási célponttól, stb. függően változhat. Általában azonban, ha a találmány szerinti fehérjét vagy hasonlókat felnőtt embereknek (60 kg testsúlyt feltételezve) adjuk be szövetregeneráló szerként egy beteg szövet kivágása után, akkor az alkalmazandó napi dózis például körülbelül 0,1 és 100 mg közötti, előnyösen körülbelül 1,0 és 50 mg közötti, még előnyösebben körülbelül 1,0 és 20 mg közötti.

(2) Gyógyszerjelöltek szűrése betegségekhez

A természetes ölő ("killer") sejtek (NK-sejtek) gátlják a rákos sejtek proliferációját. A találmány szerinti fehérje vagy hasonlók nem befolyásolják a normál sejtek proliferációját, de gátlják az NK-sejtek proliferációját, így a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók NK-sejt proliferációt gátló hatása ellen gátló aktivitással rendelkező vegyületek vagy sóik gyógyhatású anyagként, így például kezelésre vagy megelőzésre szolgáló szerként alkalmazhatók az olyan betegségekhez, mint például a különböző rákos betegségek (pl. méhtest rákja, endometrióma, emlőrák, vastag- és végbélrák, prosztatatarák, tüdőrák, veserák, neuroblasztóma, hólyagrák, mielóma).

A találmány szerinti fehérje vagy hasonlók tehát reagenskapént alkalmazhatók olyan vegyületek vagy sóik szűréséhez, amelyek gátló aktivitással rendelkeznek a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók NK-sejt proliferációt gátló hatása ellen.

A találmány tárgyát képezik tehát: (1) 1) Eljárás vegyület vagy sója szűrésére (a továbbiakban a sóját is magában foglaló vegyület megnevezés helyett a "(2) Gyógyszerjelöltek szűrése betegségekhez" című részben néhol csak "inhibitor"), amely gátló aktivitással rendelkezik a találmány szerinti fehérje vagy részpeptid, vagy ezek sói NK-sejtek proliferációjára gyakorolt gátlása ellen, amelynek során a találmány szerinti fehérjét vagy részpeptidet, vagy ezek sóját (a továbbiakban az eljárást a "(2) Gyógyszerjelöltek szűrése betegségekhez" című részben néhol a "találmány sze-

rinti szűrési eljárás" néven említjük) alkalmazzuk és 2) szűrő reagenskészlet olyan inhibitorhoz, amely tartalmazza a találmány szerinti fehérjét vagy részpeptidet, vagy ezek sóját (a továbbiakban a reagenskészletet a "(2) Gyógyszerjelöltek szűrése betegségekhez" című részben néhol a "találmány szerinti szűrő reagenskészlet" néven említjük), és közelebbről, a találmány tárgyát képezi:

(2) 1) Eljárás inhibitor szűrésére, amelynek során összehasonlítjuk (i) azt, amikor NK-sejteket a találmány szerinti fehérjével vagy részpeptiddel, vagy ezek sójával érintkeztetünk, és (ii) azt, amikor NK-sejteket és egy vizsgálandó vegyületet a találmány szerinti fehérjével vagy részpeptiddel, vagy ezek sójával érintkeztetünk, és 2) reagenskészlet inhibitor szűrésére, amelyben a találmány szerinti fehérjét vagy részpeptidet, vagy ezek sóját NK-sejtekkel érintkeztetjük.

A fenti szűrési eljárás és szűrő reagenskészlet alkalmazása során közelebbről úgy járunk el, hogy például megmérjük a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók NK-sejt proliferációt gátló hatását az (i) és az (ii) esetben, majd összehasonlítjuk a mérési adatokat.

A találmány szerinti fehérje vagy hasonlók NK-sejt proliferációt gátló aktivitását például nyilvánosan ismert eljárások vagy azok módosított változatai segítségével, előnyösen a példánál ismertetett (ld. később) eljárás segítségével mérhetjük.

A vizsgálandó vegyületek lehetnek többek között peptidek, fehérjék, nem peptid vegyületek, szintetikus vegyületek, fermentációs termékek, sejtkivonatok, növényi kivonatok, állati szövetek kivonatai és így tovább. Lehetnek továbbá új vagy ismert vegyületek.

A találmány szerinti fehérje vagy hasonlók NK-sejt-proliferációt gátló aktivitását gátló vegyületként kiválasztható például egy olyan vizsgálandó vegyület, amely az NK-sejt proliferációt gátló aktivitást a fenti (i) esettel összehasonlítva a (ii) esetben például legalább körülbelül 20%-osan, előnyösen legalább 30%-osan, még előnyösebben legalább 50%-osan gátolja.

A találmány szerinti szűrési eljárás vagy szűrő reagenskészlet alkalmazásával kapott vegyület vagy sója olyan fenti vizsgálandó vegyületek közül választható ki, mint például peptidek, fehérjék, nem peptid vegyületek, szintetikus vegyületek, fermentációs termékek, sejtkivonatok, növényi kivonatok, állati szövetek kivonatai és plazma, és olyan vegyület, amely gátló aktivitással rendelkezik a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók NK-sejt proliferációt gátló aktivitásával szemben.

A vegyület sójának típusa tekintetében ld. a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók sójánál ismertetett.

Amennyiben a találmány szerinti szűrési eljárással vagy szűrő reagenskészlet alkalmazásával kapott vegyületet a fentiek szerint kezelésre vagy megelőzésre szolgáló szerként használjuk, akkor a bevett gyakorlat szerint alkalmaz-

hatjuk. A tablettákat, kapszulákat, elixíreket, mikrokapszulákat, aszeptikus oldatokat, szuszpenziókat és egyéb készítményeket ugyanolyan módon állíthatjuk elő, mint a találmány szerinti fehérjéből vagy hasonlókból előállított gyógyászati készítményeket (ld. fent).

Az így kapott készítmények biztonságosak és alacsony toxicitásúak, és beadhatók például embernek és melegvérű állatoknak (pl. egereknek, patkányoknak, nyulaknak, juhoknak, sertéseknek, szarvasmarháknak, lovaknak, madaraknak, macskáknak, kutyáknak, majmoknak).

A vegyület vagy sója dózisa aktivitásától, a kezelendő betegségtől, a beadási célponttól, a beadás módjától, stb. függően változhat. Általában azonban, ha a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók NK-sejt proliferációt gátló hatásával szemben gátló aktivitással rendelkező vegyületet közönséges (60 kg testsúlyú) felnőtteknek orálisan adagoljuk például endometrióma kezelésére, a napi adagolási dózis körülbelül 0,1 mg és 100 mg közötti, előnyösen körülbelül 1,0 és 50 mg közötti, még előnyösebben körülbelül 1,0 és 20 mg közötti. Nem orális adagolás esetén, ha a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók NK-sejt proliferációt gátló hatásával szemben gátló aktivitással rendelkező vegyületet parenterális oldat formájában adjuk be (60 kg testsúlyú) felnőtteknek például endometrióma kezelésére, akkor a napi adagolási dózis, amelyet intravénás injekcióban adunk be, körülbelül 0,01 és 30 mg közötti, előnyösen körülbelül 0,1 és 20 mg közötti, még előnyösebben körülbelül 0,1 és 10 mg közötti, bár a vegyület egységdózisa a beadási célponttól,

a kezelendő betegségtől, stb. függően változhat. Más állatoknál a 60 kg-os testsúlynál alkalmazott dózis alapján átszámolt dózist alkalmazhatjuk.

(3) Gyógyszerjelöltek szűrése betegségekhez

Mivel a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók sejtproliferációs aktivitásúak, a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók működését (pl. sejtproliferációs aktivitását) serkenteni képes vegyület vagy sója gyógyhatású anyagként alkalmazható, így például szövetregeneráló szerként egy beteg szövet kivágása után.

A találmány szerinti fehérje vagy hasonlók működését gátolni képes vegyületek vagy sóik másrésztől gyógyhatású anyagként, így például kezelésre vagy megelőzésre szolgáló szerként alkalmazhatók az olyan betegségekhez, mint például a különböző rákos betegségek (pl. méhtest rákja, endometrióma, emlőrák, vastag- és végbélrák, prosztatarák, tüdőrák, veserák, neuroblasztóma, hólyagrák, mielóma).

A találmány szerinti fehérje vagy hasonlók tehát reagensként alkalmazhatók olyan vegyületek vagy sóik szűréséhez, amelyek serkentik vagy gátolják a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók működését.

A találmány tárgyát képezik tehát:

(1) 1) Eljárás vegyület vagy sója szűrésére, amely serkenti a találmány szerinti fehérje vagy részpeptid, vagy ezek sói működését (pl. sejtproliferációs aktivitását) (a vegyületet vagy sóját "(3) Gyógyszerjelöltek szűrése betegségekhez" című részben néhol röviden csak "serkentő" néven

említjük), vagy vegyület vagy sója szűrésére, amely gátolja a találmány szerinti fehérje vagy részpeptid, vagy ezek sói működését (pl. sejtproliferációs aktivitását) (a vegyületet vagy sóját "(3) Gyógyszerjelöltek szűrése betegségekhez" című részben néhol röviden csak "inhibitor" néven említjük), amelynek során a találmány szerinti fehérjét vagy részpeptidet, vagy ezek sóját alkalmazzuk és 2) szűrő reagenskészlet olyan serkentőhöz vagy inhibitorhoz, amely tartalmazza a találmány szerinti fehérjét vagy részpeptidet, vagy ezek sóját (a "(3) Gyógyszerjelöltek szűrése betegségekhez" című részben a reagenskészletet néhol röviden a "találmány szerinti szűrő reagenskészlet" néven említjük), és közelebbről, a találmány tárgyát képezi többek között:

(2) 1) Eljárás serkentő vagy inhibitor szűrésére, amelynek során összehasonlítjuk (i) azt, amikor sejteket [pl. a fenti különböző típusú (előnyösen humán) szövetek bármelyikéből származó normál sejteket vagy a fenti ráktípusok bármelyikéből származó rákos sejteket] a találmány szerinti fehérjével vagy részpeptiddel, vagy ezek sójával érintkeztetünk, és (ii) azt, amikor sejteket [pl. a fenti különböző típusú (előnyösen humán) szövetek bármelyikéből származó normál sejteket vagy a fenti ráktípusok bármelyikéből származó rákos sejteket] és egy vizsgálandó vegyületet a találmány szerinti fehérjével vagy részpeptiddel, vagy ezek sójával érintkeztetünk, és 2) reagenskészlet serkentő vagy inhibitor szűrésére, amelyben a találmány szerinti fehérjét vagy részpeptidet, vagy ezek sóját sejtekkel

[pl. a fenti különböző típusú (előnyösen humán) szövetek bármelyikéből származó normál sejteket vagy a fenti ráktípusok bármelyikéből származó rákos sejteket] érintkeztetjük.

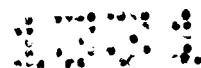
Konkrétabban szólva, a fenti szűrési eljárás jellegzetes tulajdonsága, hogy például megmérjük a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók sejtproliferáció aktivitását az (i) és az (ii) esetben, majd összehasonlítjuk a mérési adatokat.

A találmány szerinti fehérje vagy hasonlók sejtproliferációs aktivitását nyilvánosan ismert eljárások vagy azok módosított változatai segítségével mérhetjük.

Sejtként alkalmazhatunk például a fenti különböző típusú (előnyösen humán) szövetek bármelyikéből származó normál sejteket vagy a fenti ráktípusok bármelyikéből származó rákos sejteket.

A vizsgálandó vegyületek lehetnek többek között peptidek, fehérjék, nem peptid vegyületek, szintetikus vegyületek, fermentációs termékek, sejtkivonatok, növényi kivonatok, állati szövetek kivonatai és így tovább. Lehetnek továbbá új vagy ismert vegyületek.

A fenti szűrési eljárás során a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók egy, a szűréshez megfelelő pufferben történő felszuszpendálásával előállítjuk a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók egy mintáját. A puffer bármilyen puffer lehet, feltéve hogy nem gátolja a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók és a vizsgálandó vegyület közötti reakciót; lehet például körülbelül 4 és 10 közötti



(kívánt esetben körülbelül 6 és 8 közötti) pH-jú foszfátpuffer vagy Tris-hidroklorid puffer.

A találmány szerinti fehérje vagy hasonlók sejtproliferációs aktivitását serkentő vegyületként kiválasztható például egy olyan vizsgálandó vegyület, amely a sejtproliferációs aktivitást a fenti (i) esettel összehasonlítva a (ii) esetben például legalább körülbelül 20%-osan, előnyösen legalább 30%-osan, még előnyösebben legalább 50%-osan serkenti, és másrésről találmány szerinti fehérje vagy hasonlók sejtproliferációs aktivitását gátló vegyületként kiválasztható például egy olyan vizsgálandó vegyület, amely a sejtproliferációs aktivitást a fenti (i) esettel összehasonlítva a (ii) esetben például legalább körülbelül 20%-osan, előnyösen legalább 30%-osan, még előnyösebben legalább 50%-osan gátolja.

A találmány szerinti szűrési eljárás vagy szűrő reagenskészlet alkalmazásával kapott vegyület vagy sója olyan fenti vizsgálandó vegyületek közül választható ki, mint például peptidek, fehérjék, nem peptid vegyületek, szintetikus vegyületek, fermentációs termékek, sejtkivonatok, növényi kivonatok, állati szövetek kivonatai és plazma, és olyan vegyület, amely serkenti vagy gátolja a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók működését (pl. sejtproliferációs aktivitását).

A vegyület sójának típusa tekintetében ld. a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók sójánál ismertetetteket.

Amennyiben a találmány szerinti szűrési eljárással vagy szűrő reagenskészlet alkalmazásával kapott vegyületet a fentiek szerint kezelésre vagy megelőzésre szolgáló szerként használjuk, akkor a bevett gyakorlat szerint alkalmazhatjuk. A tablettákat, kapszulákat, elixíreket, mikrokapszulákat, aszeptikus oldatokat, szuszpenziókat és egyéb készítményeket ugyanolyan módon állíthatjuk elő, mint a találmány szerinti fehérjéből vagy hasonlókból előállított gyógyászati készítményeket (ld. fent).

Az így kapott készítmények biztonságosak és alacsony toxicitásúak, és beadhatók például embernek és melegvérű állatoknak (pl. egereknek, patkányoknak, nyulaknak, juhoknak, sertéseknek, szarvasmarháknak, lovaknak, madaraknak, macskáknak, kutyáknak, majmoknak).

A vegyület vagy sója dózisa aktivitásától, a kezelendő betegségtől, a beadási célponttól, a beadás módjától, stb. függően változhat. Általában azonban, ha a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók működését serkentő vegyületet (60 kg testsúlyú) felnőtt embereknek például egy beteg szövet kivágása után szövetregeneráló szerként orálisan adagoljuk, a napi adagolási dózis körülbelül 0,1 mg és 100 mg közötti, előnyösen körülbelül 1,0 és 50 mg közötti, még előnyösebben körülbelül 1,0 és 20 mg közötti. Más állatoknál a 60 kg-os testsúlynál alkalmazott dózis alapján átszámolt dózist alkalmazhatjuk.

Másrészről, ha a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók működését gátló vegyületet (60 kg testsúlyú) felnőtt embereknek például endometrióma kezelésére orálisan adagol-

juk, a napi adagolási dózis körülbelül 0,1 mg és 100 mg közötti, előnyösen körülbelül 1,0 és 50 mg közötti, még előnyösebben körülbelül 1,0 és 20 mg közötti. Más állatoknál a 60 kg-os testsúlynál alkalmazott dózis alapján átszámolt dózist alkalmazhatjuk. Nem orális adagolás esetén, ha a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók működését gátló vegyületet parenterális oldat formájában adjuk be közönséges (60 kg testsúlyú) felnőtteknek például endometrióma kezelésére, akkor a napi adagolási dózis, amelyet intravénás injekcióban adunk be, körülbelül 0,01 és 30 mg közötti, előnyösen körülbelül 0,1 és 20 mg közötti, még előnyösebben körülbelül 0,1 és 10 mg közötti, bár a vegyület egységdózisa a beadási célponttól, a kezelendő betegségtől, stb. függően változhat. Más állatoknál a 60 kg-os testsúlynál alkalmazott dózis alapján átszámolt dózist alkalmazhatjuk.

(4) A találmány szerinti fehérje vagy részpeptid, vagy ezek sója kvantitatív meghatározása

A találmány szerinti fehérjére vagy hasonlókra specifikus antitest (a továbbiakban néhol röviden a "találmány szerinti antitest") specifikusan felismeri a találmány szerinti fehérjét vagy hasonlókat, így alkalmazható egy oldatban lévő találmány szerinti fehérje vagy hasonlók különösen például szendvics-immuntesztel történő kvantitatív meghatározására.

A találmány tárgyát képezi tehát:

(i) Eljárás egy vizsgálandó oldatban lévő találmány szerinti fehérje vagy hasonlók kvantitatív meghatározására, amelynek során a találmány szerinti antitestet a vizsgálan-

dó oldattal és a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók egy jelölt formájával kompetitíven reagáltatjuk, majd meghatározzuk a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók jelölt formája antitesthez való kötődésének arányát, és (ii) Eljárás egy vizsgálandó oldatban lévő találmány szerinti fehérje vagy hasonlók kvantitatív meghatározására, amelynek során a vizsgálandó oldatot egyidejűleg vagy egymás után egy hordozóhoz immobilizált találmány szerinti antitesttel és egy másik találmány szerinti antitest egy jelölt formájával reagáltatjuk, majd mérjük az immobilizáló hordozón lévő jelölés aktivitását.

A fenti (ii) kvantitatív meghatározási eljárás során kívánatos, hogy az egyik antitest a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók N-terminálisát ismerje fel, a másik antitest pedig a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók C-terminálisával reagáljon.

A találmány szerinti fehérjét vagy hasonlók a találmány szerinti fehérjére vagy hasonlókra specifikus monoklonális antitest (a továbbiakban néhol a "találmány szerinti monoklonális antitest") segítségével is lehet kvantitatívan mérni, és ezen kívül szöveti festéssel detektálni. E célra alkalmazható maga az antitestmolekula, vagy annak $F(ab')_2$ -, Fab'- vagy Fab-frakciója.

A találmány szerinti fehérje vagy hasonlók kvantitatív meghatározására szolgáló és a találmány szerinti antitestet alkalmazó eljárás nem különösebben korlátozott, de bármilyen vizsgálati eljárás alkalmazható, feltéve hogy annak során kémiai vagy fizikai úton detektáljuk az antitest,

az antigén vagy antitest-antigén komplex mennyiségét, amely megfelel a vizsgálandó oldatban lévő antigén (pl. a fehérje) mennyiségének, majd ismert mennyiségű antigént tartalmazó standard oldatok segítségével elkészített standard görbék alapján kiszámítjuk a detektált mennyiséget. Ilyen célra alkalmasak például a nefelometriai, kompetitív, immunometriai és szendvicstechnológiák. Az érzékenység és a specifitás szempontjából különösen előnyös a szendvicstechnológiák (ld. később) alkalmazása.

A jelölt anyagokat alkalmazó vizsgálati eljárásokban a jelölés lehet például radioaktív izotóp, enzim, fluoreszcens anyag vagy lumineszcens anyag. Radioaktív izotópként alkalmazható például [^{125}I], [^{131}I], [^3H], [^{14}C], stb. Enzimjelölésként előnyösek azok az enzimek, amelyek stabilak és nagy a specifikus aktivitásuk - ilyen például a β -galaktozidáz, a β -glükozidáz, az alkalikus foszfatáz, a peroxidáz, a malát-dehidrogenáz és hasonlók. Fluoreszcens anyagként alkalmazható például fluoreszkamin és fluoreszcein-izotiocianát. Lumineszcens anyagként alkalmazható például többek között luminol, luminol-származékok, luciferin és lucigenin. Az antitest vagy az antigén jelöléshez kötéséhez alkalmazható ezen kívül biotin-avidin rendszer is.

Az antigén vagy az antitest oldhatatlanná tételéhez alkalmazható fizikai adszorpció vagy egy olyan eljárás, amelyben általában kémiai kötést alkalmaznak egy fehérje vagy enzim immobilizálásához és rögzítéséhez. Hordozóként alkalmazhatók például oldhatatlan poliszacharidok, így például agaróz, dextrán és cellulóz; szintetikus gyanták, így

például polisztirol, poliakrilamid; továbbá szilícium-vegyületek, üveg, stb.

A szendvicstechnológia szerint a vizsgálandó oldatban lévő találmány szerinti fehérje mennyiségét úgy határozhatjuk meg, hogy a vizsgálandó oldatot immobilizált találmány szerinti monoklonális antitesttel reagáltatjuk (primer reakció), majd egy másik jelölt, találmány szerinti monoklonális antitesttel (szekunder reakció), és végül mérjük az immobilizáló hordozón lévő jelölés aktivitását. A primer és szekunder reakciót fordított sorrendben, egyidejűleg vagy időben egymás után is végezhetjük. A jelölőszert és az immobilizálásra használt eljárást a fentiekben említettek közül választhatjuk ki. A szendvicstechnológiás immuntesztekben a szilárd fázishoz kötött antitest vagy a jelölt antitest nem feltétlenül jelent egyféle antitestet - a mérés érzékenységének növelése érdekében két vagy több antitest keveréke is alkalmazható.

A találmány szerinti fehérje vagy hasonló találmány szerinti szendvicstechnológiával történő meghatározása során a primer és a szekunder reakcióban használt monoklonális antitestek előnyösen különbözőek a tekintetben, hogy a találmány szerinti fehérje vagy hasonló mely részéhez kötődnek. A primer és szekunder reakcióban alkalmazott antitestek tekintetében tehát, ha a szekunder reakcióban használt antitest a találmány szerinti fehérje vagy hasonló C-terminális részéhez kötődik, akkor a primer reakcióban használt antitest előnyösen a C-terminálistól eltérő helyet, így például az N-terminális részt ismeri fel.

A találmány szerinti monoklonális antitest a szendvicstechnológiás rendszerektől eltérő rendszerekben, például kompetitív, immunometriai vagy nefelometriai is alkalmazható.

A kompetitív technológia szerint a vizsgálandó oldatban lévő antigént és egy jelölt antigént kompetitíven reagáltatjuk egy antitesttel, majd az el nem reagált jelölt antigént (F) elválasztjuk az antitesthez kötött jelölt antigéntől (B) (B/F-elválasztás), és mérjük a B vagy az F jelölését, amivel meghatározzuk a vizsgálandó oldatban lévő antigén mennyiségét. A reakció egyik megvalósítási módja lehet a folyadékfázisú technológia, amelyben antitestként oldható antitestet alkalmazunk, a B/F-elválasztást polietilén-glikollal végezzük, és alkalmazunk többek között egy, a fenti antitestre specifikus második antitestet, egy másik megvalósítási módja pedig az immobilizációs technológia, amelyben első antitestként szilárd fázishoz immobilizált antitestet alkalmazunk, vagy első antitestként szolubilis antitestet, második antitestként immobilizált antitestet alkalmazunk.

Az immunometriai technológia szerint a vizsgálandó oldatban lévő antigént és egy immobilizált antigént kompetitíven reagáltatunk egy jelölt antitest adott mennyiségével, majd elválasztjuk egymástól a szilárd és a folyékony fázist, vagy pedig a vizsgálandó oldatban lévő antigént főlös mennyiségű jelölt antitesttel reagáltatjuk, majd egy immobilizált antigént adunk hozzá, aminek eredményeként az el nem reagált jelölt antitest a szilárd fázishoz kötődik,

végül elválasztjuk egymástól a szilárd és a folyékony fázist. Ezt követően mérjük a jelölést az egyik fázisban és ezzel meghatározzuk a vizsgálandó oldatban lévő antitest mennyiségét.

A nefelometriában egy gélben vagy egy oldatban az antigén-antitest reakció eredményeként létrejövő oldhatatlan csapadék mennyiségét mérjük. Még ha az antigén kis mennyiségben is van jelen a vizsgálandó oldatban és így a kapott csapadék is kis mennyiségű, alkalmazhatjuk a lézersugarak szóródásán alapuló lézer-nefelometriát.

Ha a találmány szerinti kvantitatív vizsgálathoz a fenti immunológiai eljárásokat alkalmazzuk, semmilyen speciális feltételnek, procedúrának vagy hasonlónak nem kell megfelelni. A találmány szerinti fehérjéhez vagy hasonlóhoz alkalmazható mérési rendszerek kialakítása során a technikában jártas szakember számára szokásos műszaki szempontokat kell figyelembe venni a szokásos feltételek és procedúrák tekintetében. Az ismertetett általános technológiák további részletei megtalálhatók többek között különböző összefoglaló publikációkban és monográfiákban.

Ilyen források például a következők: Hiroshi Irie (szerk.), "Radioimmunoassay" (kiadó: Kodansha, 1974); Hiroshi Irie (szerk.), "Radioimmunoassay, Sequel" (kiadó: Kodansha, 1979); Eiji Ishikawa, és mtsai. (szerk.) "Koso Men-eki Sokuteiho (Enzyme Immunoassay)" (kiadó: Igaku Shoin, 1978); Eiji Ishikawa, és mtsai. (szerk.) "Koso Men-eki Sokuteiho (Enzyme Immunoassay)" (második kiadás, kiadó: Igaku Shoin, 1982); Eiji Ishikawa, és mtsai. (szerk.) "

Koso Men-eki Sokuteiho (Enzyme Immunoassay)" (harmadik kiadás, kiadó: Igaku Shoin, 1987); Methods in Enzymology, 70. kötet [Immunológiai Eljárások (A-rész)]; uo. 73. kötet [Immunkémiai Eljárások (B-rész)]; uo., 74. kötet [Immunkémiai Eljárások (C-rész)]; uo., 84. kötet [Immunkémiai Eljárások (D-rész: Kiválasztott Immunvizsgálati Eljárások)]; uo., 92. kötet [Immunkémiai Eljárások (E-rész: Monoklonális Antitestek és Általános Immunvizsgálati Eljárások)]; uo., 121. kötet [Immunkémiai Eljárások (I-rész: Hibridómatechnológia és Monoklonális Antitestek)] (mindhez: kiadó: Academic Press); stb.

A fenti módon a találmány szerinti fehérje vagy hasonló a találmány szerinti antitest segítségével megfelelő érzékenységgel mérhetők.

Ha továbbá a találmány szerinti fehérje vagy hasonló a találmány szerinti antitest alkalmazásával mért koncentrációjának meghatározása után növekedést mérünk a találmány szerinti fehérje vagy hasonló koncentrációjában, betegség, így például különböző típusú rákos betegségek (pl. méhtest rákja, endometrióma, emlőrák, vastag- és végbélrák, prosztatarák, tüdőrák, veserák, neuroblasztóma, hólyagrák, mielóma) meglétét diagnosztizálhatjuk vagy legalábbis igen valószínű, hogy a vizsgált alany a jövőben ilyen betegségben fog szenvedni.

A találmány szerinti antitest alkalmazható továbbá arra is, hogy segítségével egy vizsgálandó oldatban, így például egy testfolyadékban vagy szövetben detektáljuk a találmány szerinti fehérje vagy hasonló jelenlétét. Alkal-

mazható ezen kívül antitestoszlopok készítésére is többek között a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók tisztításának céljára, ahhoz, hogy a találmány szerinti fehérjét vagy hasonlókat a tisztítási lépésben kapott minden egyes frakcióban detektálni tudjuk, és elemezni tudjuk a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók viselkedését a vizsgált sejtekben.

(5) A találmány szerinti antitestet tartalmazó gyógyászati készítmények

A találmány szerinti antitest, amely közömbösítheti a találmány szerinti fehérje vagy hasonlók aktivitását (neutrizáló antitest) gyógyhatású anyagként, így például kezelésre vagy megelőzésre szolgáló szerként alkalmazhatók az olyan betegségekhez, mint például a különböző rákos betegségek (pl. méhtest rákja, endometrióma, emlőrák, vastag- és végbélrák, prosztatatarák, tüdőrák, veserák, neuroblasztóma, hólyagrák, mielóma).

A találmány szerinti fehérjére vagy hasonlókra specifikus humanizált antitest gyógyhatású anyagként, így például kezelésre vagy megelőzésre szolgáló szerként alkalmazhatók az olyan betegségekhez, mint például a különböző rákos betegségek (pl. méhtest rákja, endometrióma, emlőrák, vastag- és végbélrák, prosztatatarák, tüdőrák, veserák, neuroblasztóma, hólyagrák, mielóma).

A fenti humanizált antitestet például az alábbi publikációkban ismertették szerint állíthatjuk elő: Nat. Biotechnol. 14, 845-851 (1996); Nat. Genet. 15, 146-156 (1997); vagy PNAS 97(2), 722-727 (2000).

A továbbiakban az "(5) A találmány szerinti antitestet tartalmazó gyógyászati készítmények" című részben a találmány szerinti neutralizáló antitestet és humanizált antitestet összefoglalóan a "találmány szerinti antitest" néven említjük.

A fent említett betegségek kezelésére vagy megelőzésére alkalmas, találmány szerinti antitestet tartalmazó szert adagolhatjuk önmagában egy folyékony készítmény formájában, vagy megfelelő gyógyászati készítmény formájában, orálisan vagy nem orálisan, embereknek és emlősöknek (pl. patkányoknak, nyulaknak, juhoknak, sertéseknek, szarvasmarháknak, macskáknak, kutya-knak, majmoknak). Bár a dózis a beadási célponttól, a megcélzott betegségtől, a tünetektől, a beadási módjától és hasonlóktól függően változhat, endometrióma kezelésekor és/vagy megelőzésekor a találmány szerinti antitestet felnőtt embereknek általában testsúlykilogrammonként körülbelül 0,01-20 mg, előnyösen körülbelül 0,1-10 mg, még előnyösebben körülbelül 0,1-5 mg egységdózisban adagoljuk, körülbelül napi 1-5 alkalommal, előnyösen körülbelül napi 1-3 alkalommal, lehetőleg intravénás injekcióval. Egyéb nem orális, vagy orális adagolás esetén az ennek megfelelő dózist adhatjuk be. Amennyiben a tünetek, különösen súlyosak, a tüneteknek megfelelő növelhetjük is a dózist.

A találmány szerinti antitestet adagolhatjuk önmagában, vagy megfelelő gyógyászati készítmény formájában. A beadáshoz használt gyógyászati készítmény tartalmazza a fenti találmány szerinti antitestet vagy sóját, és egy gyó-

gyászatilag elfogadható hordozót, hígítószert vagy kötőanyagot. Az ilyen készítményeket orális vagy nem orális adagoláshoz megfelelő dózisformákban állítjuk elő.

Orális beadás esetén tehát a készítmények lehetnek szilárd vagy folyékony dózisformák, konkrétan tabletták (ezen belül cukorbevonatú vagy filmbevonatú tabletták), pirulák, granulumok, porok, kapszulák (ezen belül lágykapszulák is), szirupok, emulziók, szuszpenziók, stb. A készítményeket nyilvánosan ismert eljárásokkal állíthatjuk elő, és a gyógyszerészet területén közönségesen alkalmazott hordozót, hígítószert vagy kötőanyagot tartalmazhatnak. Tablettákhoz hordozóként vagy kötőanyagként alkalmazhatunk például laktózt, keményítőt, szacharózt, magnézium-sztearátot és hasonlókat.

Nem orális beadás esetén a készítmény lehet például parenterális oldat vagy végbélkúp. A parenterális oldatok az alábbi dózisformák lehetnek: intravénás, szubkután, intradermális, intramuszkuláris injekciós, valamint csepp-injekciós oldatok. Az ilyen parenterális oldatokat nyilvánosan ismert eljárások segítségével állíthatjuk elő, így például a fenti antitest vagy sója olyan steril vizes vagy olajos közegben történő feloldásával, felszuszpendálásával vagy emulgeálásával, amelyet parenterális termékek előállításában közönségesen használnak. Injekciókhoz vizes közegként például fiziológiás sóoldatot vagy glükózt és más segédanyagokat tartalmazó izotóniás oldatot alkalmazhatunk, amelyek tartalmazhatnak még megfelelő oldódási segédanyagokat, így például alkoholt (pl. etanol), polialkoholt (pl.

propilénglikol, polietilénglikol) vagy nemionos felületaktív anyagot [pl. poliszorbát 80TM, HCO-50 (a hidrogénezett ricinusolaj polioxietilén(50 mól) adduktuma)]. Olajos közegként alkalmazható például szezámolaj és szójaolaj, amelyekhez oldódási segédanyagként adhatunk még benzil-benzoátot, benzil-alkoholt vagy hasonlókat is. Az előállított parenterális oldatot általában megfelelő ampullákba töltjük. A végbélen keresztüli adagolásra alkalmazható végbélkúp előállítása során a fenti antitestet vagy sóját szokásos végbélkúp-alapanyagot keverünk.

Az orális és nem orális adagolásra alkalmazható fenti gyógyászati készítményt lehetőleg olyan egységdózisok formájában állítjuk elő, amely megfelel az aktív hatóanyag dózisának. Ilyen egységdózis formák például többek között a tabletták, pirulák, kapszulák, parenterális oldatok (ampullák) és végbélkúpok. Minden egységdózis forma általában körülbelül 5-500 mg aktív hatóanyagot tartalmaz, különösen pedig parenterális oldatok esetében minden egyes egységdózis forma előnyösen 5-100 mg, más dózisformák esetében pedig 10-250 mg-ot tartalmaz a fenti antitestből.

A leírásban és a leíráshoz tartozó ábrákon a bázisok vagy aminosavak jelölésére használt rövidítések az IUPAC-IUB Biokémiai Nevezéktani Bizottság irányelvein vagy a szakterületen hagyományosan alkalmazott rövidítéseken alapulnak. Az alábbiakban erre adunk példákat. Ahol az aminosavaknál előfordulhat optikai izoméria, egyébirányú jelzés hiányában az L-formát értettük.

DNS: dezoxiribonukleinsav
cDNS: komplementer dezoxiribonukleinsav
A: adenin
T: timin
G: guanin
C: citozin
I: inozin
R: adenin (A) vagy guanin (G)
Y: timin (T) vagy citozin (C)
M: adenin (A) vagy citozin (C)
K: guanin (G) vagy timin (T)
S: guanin (G) vagy citozin (C)
W: adenin (A) vagy timin (T)
B: guanin (G), guanin (G) vagy timin (T)
D: adenin (A), guanin (G) vagy timin (T)
V: adenin (A), guanin (G) vagy citozin (C)
RNS: ribonukleinsav
mRNS: hírvivő ("meszendzser") ribonukleinsav
dATP: dezoxiadenozin-trifoszfát
dTTP: dezoxitimin-trifoszfát
dGTP: dezoxiguanozin-trifoszfát
dCTP: dezoxicitozin-trifoszfát
ATP: adenozin-trifoszfát
Gly: glicin
Ala: alanin
Val: valin
Leu: leucin
Ile: izoleucin

Ser:	szerin
Thr:	treonin
Cys:	cisztein
Met:	metionin
Glu:	glutaminsav
Asp:	aszparaginsav
Lys:	lizin
Arg:	arginin
His:	hisztidin
Phe:	fenilalanin
Tyr:	tirozin
Trp:	triptofán
Pro:	prolin
Asn:	aszparagin
Gln:	glutamin
pGlu:	piroglutaminsav

A leírásban a gyakran előforduló szubsztituenseket, védőcsoportokat és reagenseket az alábbi szimbólumokkal jelöljük:

Me:	metilcsoport
Et:	etilcsoport
Bu:	butilcsoport
Ph:	fenilcsoport
TC:	tiazolidon-4(R)-karboxamido-csoport
Tos:	p-toluolszulfonil
CHO:	formil
Bzl:	benzil

Cl ₂ -Bzl:	2,6-diklórbenzil
MBzl:	metoxibenzil
MeBzl:	4-metilbenzil
OcHex:	ciklohexil-észter
OBzl:	benzil-észter
Bom:	benziloximetil
Z:	benziloxikarbonil
Cl-Z:	2-klórbenziloxikarbonil
Br-Z:	2-brómbenziloxikarbonil
Boc:	t-butoxikarbonil
DNP:	dinitrofenil
Trt:	tritol
Bom:	t-butoximetil
Fmoc:	N-9-fluorenilmetoxikarbonil
HOBT:	1-hidroxibenzotriazol
HOObt:	3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3- benzotriazin
HONB:	1-hidroxi-5-norbornén-2,3-dikarboxiimid
DCC:	N,N'-diciklohexilkarbodiimid
DMF:	N,N-dimetilformamid
TEA:	triethylamin
WSCD:	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EDTA:	etiléndiamintetraecetsav
SDS:	nátrium-dodecyl-szulfát

A leíráshoz tartozó szekvencialistában a szekvencia-azonosítószámok az alábbiakat jelölik:

Az 1. azonosítószámú szekvencia egy találmány szerinti humán eredetű fehérje (TGC839-fehérje) aminosavszekvenciáját mutatja.

A 2. azonosítószámú szekvencia az 1. azonosítószámon megadott aminosavszekvenciájú, találmány szerinti, humán eredetű fehérjét kódoló DNS szekvenciáját mutatja.

A 3. azonosítószámú szekvencia egy, a 3. példában alkalmazott szintetikus DNS-láncindító nukleotidszekvenciáját mutatja.

A 4. azonosítószámú szekvencia egy, a 3. példában alkalmazott szintetikus DNS-láncindító nukleotidszekvenciáját mutatja.

Az 5. azonosítószámú szekvencia egy találmány szerinti humán eredetű fehérje (TGC838-fehérje) aminosavszekvenciáját mutatja.

A 6. azonosítószámú szekvencia az 5. azonosítószámon megadott aminosavszekvenciájú, találmány szerinti, humán eredetű fehérjét kódoló DNS szekvenciáját mutatja.

A 7. azonosítószámú szekvencia egy, a 7. és a 20. példában alkalmazott szintetikus DNS-láncindító nukleotidszekvenciáját mutatja.

A 8. azonosítószámú szekvencia egy, a 7. példában alkalmazott szintetikus DNS-láncindító nukleotidszekvenciáját mutatja.

A 9. azonosítószámú szekvencia egy, a 20. példában alkalmazott szintetikus DNS-láncindító nukleotid-szekvenciáját mutatja.

A 3. példában kapott *Esherichia coli* SURE/pCAN618/H839F transzformánst (ld. később) FERM BP-6677 hozzáférési szám alatt 1999. március 10-én a Nemzetközi Ipari és Kereskedelmi Minisztérium Nemzeti Élettudományi és Humántechnológiai Intézeténél (NIBH) (1-3 Higashi 1-chome, Tsukuba, Ibaraki, Japán) és IFO 16259 hozzáférési szám alatt 1999. február 25-én az Osakai Fermentációs Intézetnél (IFO) (17-85 Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka, Osaka, Japán) helyeztük letétbe.

A 7. példában kapott *Esherichia coli* XL-10-Gold/pCAN618/H838F transzformánst (ld. később) FERM BP-6809 hozzáférési szám alatt 1999. augusztus 2-án a Nemzetközi Ipari és Kereskedelmi Minisztérium Nemzeti Élettudományi és Humántechnológiai Intézeténél (NIBH) és IFO 16297 hozzáférési szám alatt 1999. július 21-én az Osakai Fermentációs Intézetnél (IFO) helyeztük letétbe.

A 15. példában kapott 112-3. számú hibridómaklont (ld. később) 839N-112 jelöléssel FERM BP-7068 hozzáférési szám alatt 2000. március 2-án helyeztük letétbe a Nemzetközi Ipari és Kereskedelmi Minisztérium Nemzeti Élettudományi és Humántechnológiai Intézeténél (NIBH).

A 15. példában kapott 128-18. számú hibridómaklont (ld. később) 839N-128 jelöléssel FERM BP-7069 hozzáférési szám alatt 2000. március 2-án helyeztük letétbe a Nemzetkö-

zi Ipari és Kereskedelmi Minisztérium Nemzeti Élettudományi és Humántechnológiai Intézeténél (NIBH).

A 22. példában kapott CHO-K1/TGC838N-4 sejtvonalat (ld. később) FERM BP-7088 hozzáférési szám alatt 2000. március 10-én helyeztük letétbe a Nemzetközi Ipari és Kereskedelmi Minisztérium Nemzeti Élettudományi és Humántechnológiai Intézeténél (NIBH).

A 23. példában kapott CHO-K1/618/839F6-3 sejtvonalat (ld. később) FERM BP-7089 hozzáférési szám alatt 2000. március 10-én helyeztük letétbe a Nemzetközi Ipari és Kereskedelmi Minisztérium Nemzeti Élettudományi és Humántechnológiai Intézeténél (NIBH).

A 28. példában kapott 839-01 jelű hibridómát (ld. később) FERM BP-7086 hozzáférési szám alatt 2000. március 10-én helyeztük letétbe a Nemzetközi Ipari és Kereskedelmi Minisztérium Nemzeti Élettudományi és Humántechnológiai Intézeténél (NIBH).

A 28. példában kapott 839-02 jelű hibridómát (ld. később) FERM BP-7087 hozzáférési szám alatt 2000. március 10-én helyeztük letétbe a Nemzetközi Ipari és Kereskedelmi Minisztérium Nemzeti Élettudományi és Humántechnológiai Intézeténél (NIBH).

A alábbi példák segítségével konkrétabban is bemutatjuk a találmányt. A példák azonban semmilyen módon nem korlátozzák a találmány oltalmi körét. Az *Escherichia coli*-t alkalmazó génmanipulációs eljárásokat a "Molecular Cloning"-ból vettük.

1. példa

Klón kiválasztása egy adatbázisból

A SmithKline Beecham (SB) adatbázisából kiválasztottunk egy olyan klónt, amelynek aminosavszekvenciája jellemző fehérjék egy szekréciós szekvenciájára.

Miután tehát minden egyes EST nukleotidszekvenciáját átfordítottuk aminosavszekvenciára, kiválasztottuk azokat az EST-klónokat, amelyeknek az 5'-végén Met van, az 5'-végén van egy hidrofób aminosavszekvencia, ettől 3'-irányban egy hidrofil és egy hidrofób aminosavszekvencia, továbbá az első Met-től számított 10-30. aminosavak fehérjeszekréciós szignálszekvenciát alkotnak. Így találtuk meg az egyik klónt, a HGS:2772893-at. Ezt a klónt megrendeltük a SmithKline Beecham-tól és elneveztük TGC839-nek. Egy, a gént tartalmazó plazmiddal transzformált *E. coli*-törzset szokásos módon tenyésztettünk, megtisztítottuk a plazmidot és a gént EcoRI és XhoI restrikciós enzimekkel kivágtuk, amelynek eredményeként egy körülbelül 0,9 kb és egy körülbelül 0,5 kb hosszúságú génfragmenst kaptunk. Ebből tehát megállapítottuk, hogy a gén mérete körülbelül 1,4 kb.

Ezt követően ABI 377 Prism típusú fluoreszcens DNS-szekvenáló készülékben a T7- és T3-láncindítók alkalmazásával meghatároztuk a gén szekvenciáját. A kapott nukleotidszekvencia és aminosavszekvencia az 1. ábrán látható.

Ez a gén egy 252 aminosav hosszúságú fehérjét kódol és úgy becsültük, hogy a szignálszekvencia az (N-terminálistól számított) 25. aminosav (Ala) és 26. aminosav (Gly) között hasad el.

2. példa

A génexpresszió ellenőrzése

Az 1. példában kapott gén valószínű funkciójának meghatározása érdekében megvizsgáltuk a gén expresszióját különböző humán szövetekben és rákos sejtvonalakban.

Első lépésben különböző szövetekből és sejtekből nyert mRNS-mintákat Northern-blottal megvizsgáltunk, amelyhez próbaként egy, a gén EcoRI-gyel és XhoI-gyel való hasítása után kapott körülbelül 900 bázis hosszúságú DNS-fragmenst alkalmaztunk. A Clonotech által gyártott, humán szöveteket tartalmazó Northern-blottal [human multi tissue northern (MTN) blot] vagy humán rákos sejtvonalakból származó mRNS-blottal vagy különböző humán rákos sejtvonalakból származó mRNS-sel blottolt nylonfiltereket rutin módon izotópjelölt DNS-próbákkal reagáltattuk, majd a filterek mosása után autoradiográfiát készítettünk és megvizsgáltuk, hogy mely szövetek és sejtek expresszálják ezt a gént.

Normál humán szövetekben a gén expresszióját alig lehetett felismerni. Specifikus expressziót csak rákos sejtekben, valamint fetális agyban és tüdőben figyeltünk meg (2. és 3. ábra).

3. példa

Expressziós vektor előállítás a humán TGC839-fehérje állati sejtekben való expresszáltatásához

Előállítottunk egy expressziós vektort a humán TGC839-fehérje állati sejtekben történő expresszáltatásához. Ennek során a TGC839-fehérje C-terminálisához az expressziós termék későbbiekben történő felismerésének meg-

könnyítése érdekében egy 8 aminosavból álló FLAG-szekvenciát (DYKDDDDK) vittünk be.

A továbbiakban a FLAG-szekvenciát tartalmazó TGC839-fehérjét néhol specifikusan "TGC839FLAG fehérje" néven említjük.

Első lépésben a TGC839-fehérjét kódoló cDNS-fragmenst alkalmazva templátként PCR-t végeztünk az alábbi szintetikus DNS-ekkel: egy szintetikus DNS, amely egy EcoRI restrikciós helyet visz be közvetlenül az ATG transzláció-iniciációs kodontól 5'-irányba [5' GCGCTCGAATTCC ACCATGGCAGCAGCCGCCGCTACCAAG 3': 3. azonosítószámú szekvencia]; és egy szintetikus DNS, amely a TGC839-fehérje C-terminálisára egy DYKDDDDK aminosavszekvenciát, utána közvetlenül a terminációs kodont, majd egy NotI restrikciós helyet visz be [5' GCGGCCGCTCACTTGTCATCGTCGTCCTTGTCCTCTA AAGGACTCTCCTCAGATGCCAGGGAGGATGAAGCAG 3': (4. azonosítószámú szekvencia)], aminek eredményeként egy, a TGC839 ORF-jét tartalmazó DNS-fragmenst kaptunk. Ezt a DNS-fragmenst EcoRI (Takara Shuzo) és EagI (New England Biolabs) restrikciós enzimekkel emésztettük, majd beillesztettük egy pCAN618 EcoRI-NotI helyére, így kaptuk a pCAN618/H839F expressziós vektort, amelynek segítségével állati sejtekben expresszálhatjuk a TGC839FLAG fehérjét, azaz a C-terminálisán FLAG-szekvenciát tartalmazó humán TGC839-fehérjét. *Escherichia coli* SURE-törzsét nyilvánosan ismert eljárással a pCAN618/H839F-fel transzformáltuk, így kaptuk az *Escherichia coli* SURE/pCAN618/H839F-et.

4. példa

A humán TGC839-fehérje szekréciós expresszáltatása COS-7 sejttenyészet felülúszójába

Annak ellenőrzésére, hogy a humán TGC839-fehérje szekretált fehérje, a TGC839FLAG fehérjét COS-7 sejtekben expresszáltattuk és vizsgáltuk, hogy a tápközegbe szekretálódik-e, avagy sem. A 3. példában előállított expressziós vektorral való transzfektálás előtti napon a COS-7 sejteket 4×10^5 sejt/lyuk sűrűségből kiindulva 10% FBS-t (Hyclone) tartalmazó DMEM-tápközegben (Gibco-BRL), CO₂-inkubátorban, 24 órán át növesztettük. Ezt követően pCAN618/H839F DNS-sel és Effectene-nel (Qiagen) transzfektáltuk, majd 24 óra múlva a tápközeget 0,1 mM ADSF-et [4-(2-aminoetil)benzolszulfonil-fluorid (hidroklorid)] (Wako Pure Chemicals) és 0,05% CHAPS-ot [(3-(3-kolamidopropil)dimetilammónio)propánszulfonsav] (Dojin Kagaku) tartalmazó Opti-MEM tápközegre (Gibco-BRL) (1 ml) cseréltük és további 36 órán át inkubáltuk. A tenyészet felülúszóját egy Eppendorf-csőbe pipettáztuk és lecentrifugáltuk, majd a lebegő sejtek eltávolítása után Centricon-10 cső (Amicon) alkalmazásával 1/10-ére töményítettük. Ezt követően azonos mennyiségű DTT-t tartalmazó SDS-PAGE mintapuffert adtunk hozzá és az elegyet SDS-PAGÉ-n megfuttattuk. Ezt követően Western-blotolást végeztünk, amelyhez első antitestként anti-FLAG egér IgG monoklonális antitestet (M12; 5 mg/ml, Sigma), második antitestként pedig HRP-vel (torma-peroxidázzal) jelölt anti-egér IgG antitestet (1/2000, Amersham) alkalmaztunk.

Ennek eredményeként a TGC839FLAG fehérjét egyetlen, körülbelül 34 kDa-os fehérjeként detektáltuk intracellulárisan és a tenyészet felülúszójában, amelyben a sáv szélesebb volt, mint az intracellulárisan detektált sáv (4. ábra). Ennek fényében úgy véltük, hogy a TGC839-fehérje a tápközegbe szekretálódik, és ennek során a fehérjében előforduló mindkét típusú N-glikozilációs helyhez egy cukorlánc kapcsolódik.

5. példa

Klón kiválasztása egy adatbázisból

A SmithKline Beecham (SB) adatbázisából kiválasztottunk egy olyan klónt, amelynek aminosavszekvenciája jellemző fehérjék egy szekréciós szekvenciájára.

Miután tehát minden egyes EST nukleotidszekvenciáját átfordítottuk aminosavszekvenciára, kiválasztottuk azokat az EST-klónokat, amelyeknek az 5'-végén Met van, az 5'-végén van egy hidrofób aminosavszekvencia, ettől 3'-irányban egy hidrofil és egy hidrofób aminosavszekvencia, továbbá az első Met-től számított 10-30. aminosavak fehérjeszekréciós szignálszekvenciát alkotnak. Így találtuk meg az egyik klónt, a HGS:951123-at. Ezt a klónt megrendeltük a SmithKline Beecham-tól és elneveztük TGC838-nak. Egy, a gént tartalmazó plazmiddal transzformált *E. coli*-törzset szokásos módon tenyésztettünk, megtisztítottuk a plazmidot és a gént EcoRI és XhoI restriktációs enzimekkel kivágtuk, amelynek eredményeként egy körülbelül 1,0 kb és egy körülbelül 0,4 kb hosszúságú génfragmenst kaptunk. Ebből tehát megállapítottuk, hogy a gén mérete körülbelül 1,4 kb.

Ezt követően ABI 377 Prism típusú fluoreszcens DNS-szekvenáló készülékben a T7- és T3-láncindítók alkalmazásával meghatároztuk a gén szekvenciáját. A kapott nukleotidszekvencia és aminosavszekvencia az 5. ábrán látható.

Ez a gént egy 246 aminosav hosszúságú fehérjét kódol és úgy becsültük, hogy a szignálszekvencia az (N-terminálistól számított) 25. aminosav (Ala) és 26. aminosav (Gly) között hasad el.

6. példa

A génexpresszió ellenőrzése

Az 5. példában kapott gén valószínű funkciójának meghatározása érdekében megvizsgáltuk a gén expresszióját különböző humán szövetekben és rákos sejtvonalakban.

Első lépésben különböző szövetekből és sejtekből nyert mRNS-mintákat Northern-blottal megvizsgáltunk, amelyhez próbaként egy, a gén EcoRI-gyel és XhoI-gyel való hasítása után kapott körülbelül 1,0 kb hosszúságú DNS-fragmenst alkalmaztunk. A Clontech által gyártott humán szöveteket tartalmazó Northern-blottal [*human multi tissue northern blot* (MTN)] vagy humán rákos sejtvonalakból származó mRNS-blottal vagy különböző humán rákos sejtvonalakból származó mRNS-sel blottolt nylonfiltereket rutin módon izotópjelölt DNS-próbákkal reagáltattuk, majd a filterek mosása után autoradiográfiát készítettünk és megvizsgáltuk, hogy mely szövetek és sejtek expresszálják ezt a gént.

Normál humán szövetekben a gén expresszióját alig lehetett felismerni. Specifikus expressziót csak rákos sejtekben, valamint fetális agyban és tüdőben figyeltünk meg (6. ábra).

7. példa

Expressziós vektor előállítása a humán TGC838-fehérje állati sejtekben való expresszáltatásához

Előállítottunk egy expressziós vektort a humán TGC838-fehérje állati sejtekben történő expresszáltatásához. Ennek során a TGC838-fehérje C-terminálisához az expressziós termék későbbiekben történő felismerésének megkönnyítése érdekében egy 8 aminosavból álló FLAG-szekvenciát (DYKDDDDK) vittünk be.

A továbbiakban a FLAG-szekvenciát tartalmazó TGC838-fehérjét néhol specifikusan "TGC838FLAG fehérje" néven említjük.

Első lépésben a TGC838-fehérjét kódoló cDNS-fragmenst alkalmazva templátként PCR-t végeztünk az alábbi szintetikus DNS-ekkel: egy szintetikus DNS, amely egy EcoRI restrikciós helyet visz be közvetlenül az ATG transzláció-iniciációs kodontól 5'-irányba [5' GCGCTGAATT CCCACCATGG CAGCAGCCGCC GCTACCAAGA TCCTTCTGTG CCTCCCGCTT CT 3': 7. azonosítószámú szekvencia]; és egy szintetikus DNS, amely a TGC838-fehérje C-terminálisára egy DYKDDDDK aminosavszekvenciát, utána közvetlenül a terminációs kodont, majd egy NotI restrikciós helyet visz be [5' TTGCGGCCGC TCACTTGTCATCGTCGTCCT TGTAGTCGAT GCCAGGGAGG ATGAAGCAGG GGAGGATGAT G 3': (8. azonosítószámú szekvencia)], aminek eredményeként

egy, a TGC838 ORF-jét tartalmazó DNS-fragmenst kaptunk. Ezt a DNS-fragmenst EcoRI és NotI restriktációs enzimekkel emésztettük, majd beillesztettük egy pCAN618 EcoRI-NotI helyére, így kaptuk a pCAN618/H838F expressziós vektort, amelynek segítségével állati sejtekben expresszálhatjuk a TGC838FLAG fehérjét, azaz a C-terminálisán FLAG-szekvenciát tartalmazó humán TGC838-fehérjét.

A találmány szerinti pCAN618/H839F plazmidot bevittük *Escherichia coli* XL10-Gold törzsébe, így kaptuk az *Escherichia coli* XL10-Gold/pCAN618/H838F transzformánst.

8. példa

A humán TGC839-fehérje tisztítása COS-7 sejtenyészet felülúszójából

Mivel a 4. példában megállapítottuk, hogy a TGC839-fehérje a COS-7 sejtenyészet felülúszójába szekretálódik, a humán TGC839FLAG fehérje a COS-7 sejtenyészet felülúszójából tisztítottuk. A 3. példában előállított expressziós vektorral való transzfektálás előtti napon tíz 10 cm-es edénybe edényenként 2×10^6 sejtet tettünk, majd 10% FBS-t (Hyclone) tartalmazó DMEM-tápközegben (Gibco-BRL), CO₂-inkubátorban, 24 órán át növesztettük. Ezt követően pCAN618/H839F DNS-sel és Effectene-nel (Qiagen) transzfektáltuk, majd 24 óra múlva a tápközeget 0,1 mM ADSF-et (Wako Pure Chemicals) és 0,05% CHAPS-ot (Dojin Kagaku) tartalmazó Opti-MEM tápközegre (Gibco-BRL) (4 ml) cseréltük és további 36 órán át inkubáltuk. A tíz 10 cm-es edényből a tenyészetek felülúszóját egy 50 ml-es centrifugacsőbe pipettáztuk és a lebegő sejtek eltávolítása érdeké-

ben lecentrifugáltuk, majd 0,2 μ m-es ultrafilter-membránon filtráltuk. A filtrátumhoz annyi 20-szor tömény TBS-t adtunk, hogy végkoncentrációja egyszeres legyen, majd kétszer ismételve ANTI FLAG M2-agaróz affinitásgélhez (Sigma) adszorbeáltuk, és a kívánt fehérjét glicin-HCl pufferrel (pH 3,5) eluáltuk. Az eluátum pufferét egy sótalanító oszlopon (PD-10, AmershamPharmacia) PBS-re cseréltük, majd Centriplus-10, Centricon-10 csövön (Amicon) körülbelül 60 μ l-re töményítettük. Az így kapott tisztított mintát SDS-PAGÉ-n megfuttattuk, majd a gelet CBB-vel festettük. A gélen így egyetlen, körülbelül 45 kDa-os széles sávot láttunk.

9. példa

A tisztított humán TGC839FLAG fehérje N-terminális aminosavszekvencia meghatározása

A 8. példában kapott tisztított minta 2 μ l-éből egy gázfázisú aminosav-szekvenátorban (LF300 fehérjeszekvenátor, Beckman-Coulter) meghatároztuk az N-terminális aminosavszekvenciát. Ennek eredményeként azt kaptuk, hogy az N-terminálistól számított 1. aminosav glicin (5,10 pmól), a 2. arginin (6,53 pmól), a 3. alanin (3,97 pmól) és a 4. aszparagin (6,92 pmól).

A fentiek alapján azt találtuk, hogy a TGC839-fehérje a humán TGC839 prekurzorfehérje első 25 N-terminális aminosavának lehasadása után a 26. aminosavtól (glicin) kezdődő humán érett TGC839-fehérje formájában szekretálódik a tápközegbe.

10. példa

A Gly-Arg-Ala-Asp-Pro-His-Ser-Leu-Cys TGC839(26-34)-
peptid előállítás

A 2,27 g kiindulási anyag Boc-csoportját, a Boc-Cys(MBzl)-OBzl csoportot 4 N HCl·etilacetáttal távolítottuk el, a HCl-sót ekvimoláris mennyiségű TEÁ-val semlegesítettük és HONB/WSCD·HCl jelenlétében Boc-Leu·H₂O-val kondenzáltuk. A reakcióelegyet etilacetáttal extraháltuk, az extraktumot 0,1 N HCl-lel és nátrium-bikarbonát 5%-os vizes oldatával mostuk, majd vízmentes nátrium-szulfáton szárítottuk és eltávolítottuk az oldószert. A maradékot etilacetátból és hexánból átkristályosítottuk, majd a kristályokat filtrálással gyűjtöttük össze. 2,3 g (80,3%). A Boc-Leu-Cys(MBzl)-OBzl-hez ezután Boc-Ser(Bzl)-t és Boc-His(Bom)-t kondenzáltunk, így 1,23 g Boc-His(Bom)-Ser(Bzl)-Leu-Cys(MBzl)-OBzl-t (I. vegyület) kaptunk. Pro-OBzl-ből kiindulva Boc-Asp(OcHex)-Pro-OBzl-t szintetizáltunk, majd ezt katalitikusan redukáltuk, hogy eltávolítsuk a benzilésztert és megkapjuk az olajos Boc-Asp(OcHex)-Pro-OH-t (II. vegyület). Ala-OBzl-ből kiindulva hozzákondenzáltunk Boc-Arg(Tos)-t és Boc-Gly-t, így kaptuk a Boc-Gly-Arg(Tos)-Ala-OBzl-t, amelyet katalitikusan redukáltunk. A kapott Boc-Gly-Arg(Tos)-Ala-OH-t (III. vegyület) acetonitrilből és dietiléterből filtrálással por formájában nyertük ki. Az I. vegyület 0,407 g-jából a Boc-csoportot 4 N HCl·etilacetáttal távolítottuk el, majd az így kapott anyagot DMF-ben feloldottuk, 62 µl TEÁ-val semlegesítettük, majd 225 mg HOBt és 160 mg WSCD·HCl segítségével 0,23 g II. vegyületet kondenzáltunk hozzá. A reakcióelegyet

etilacetáttal extraháltuk, az extraktumot nátrium-bikarbonát 5%-os vizes oldatával mostuk, majd vízmentes nátrium-szulfáton szárítottuk és eltávolítottuk az oldószert. A maradékot acetonitrilből és dietiléterből filtrálással por formájában nyertük ki, így kaptuk a 338 mg (63,8%) Boc-Asp(OcHex)-Pro-His(Bom)-Ser(Bzl)-Leu-Cys(MBzl)-OBzl-t (IV. vegyület). A IV. vegyület 187 mg-jából a Boc-csoportot 4 N HCl·etilacetáttal távolítottuk el, majd az így kapott anyagot (IV. vegyület) DMF-ben feloldottuk, 22 µl TEA-val semlegesítettük, majd 79 mg HOBt és 56 mg WSCD·HCl segítségével 90 g III. vegyületet kondenzáltunk hozzá. Eltávolítottuk az oldószert és a gélyszerű Boc-Gly-Arg(Tos)-Ala-Asp(OcHex)-Pro-His(Bom)-Ser(Bzl)-Leu-Cys(MBzl)-OBzl-t etilacetátból nyertük ki. Ennek 117,8 mg-ját 974 mg p-krezol jelenlétében, 0°C-on, 60 percig 10 ml vízmentes hidrogén-fluoriddal kezeltük, így az összes védőcsoportot eltávolítottuk. A peptidfrakciót 50%-os ecetsav-víz eleggyel feltöltött Sephadex™ G-25-oszlopon (2,0 × 80 cm) frakcionáltuk. A fő frakciót azután felvittük egy LiChroprep™ RP-18 töltetű reverzfázisú kromatográfiás oszlopra (2,6 × 8,0 cm), majd az így kapott fő frakciót liofilizáltuk, aminek eredményeként 30 g fehér port kaptunk.

Tömegspektrometriás elemzés (M + H)⁺: 955,4 (számított érték 955,4).

HPLC-elúciós idő: 10,5 perc.

Az oszlop jellemzői:

Oszlop: Wakosil 5C18T, 4,6 × 100 mm

Eluens: A-oldat: 0,1% TFA vízben, B-oldat: 0,1% TFA acetonitrilben, lineáris koncentráció gradiens: A/B = 95/5-től A/B = 45/55-ig (25 perc).

Átfolyási sebesség: 1,0 ml/perc.

11. példa

TGC839(26-34)-peptidet tartalmazó immunogén előállítása

A 10. példában előállított TGC839(26-34)-peptidből és szarvasmarha tiroglobulinból (BTG) konjugátumot készítettünk és immunogénként alkalmaztuk. Ehhez 10,5 mg BTG-t feloldottunk 0,9 ml 0,1 M foszfátpufferben (pH 6,7), majd az oldathoz 100 μ l, 1,2 mg N-(γ -maleimidobutiril-oxi)szukcinimidet (GMBS) tartalmazó DMF-et adtunk 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A GMBS-reagens feleslegét 2 mM EDTÁ-t tartalmazó 0,1 M foszfátpufferrel (pH 6,5) ekvilibrált Sephadex G-25 oszlop alkalmazásával távolítottuk el, majd a már maleimidcsoportot tartalmazó BTG 7,5 mg-jához 0,2 ml, 1,5 mg TGC839(26-34)-peptidet tartalmazó DMF-et adtunk és 4°C-on 2 napig inkubáltuk. Ezt követően a reakcióelegyet 4°C-on, 2 napig fiziológiás sóoldattal szemben dializáltuk.

12. példa

Immunizálás

Héthetes nőstény BALB/C-egereket szubkután úton 120 μ g immunogénnel [a 11. példában ismertetett TGC839(26-34)-peptid-BTG konjugátummal] immunizáltunk komplett Freund-féle adjuváns alkalmazása mellett. Hat hét múlva emlékeztető injekcióként beadtuk az immunogén azonos dózisát

és Freund-féle inkomplett adjuvánst, majd egy héttel később érmintákat vettünk.

13. példa

Enzimmel jelölt antigén előállítása

Torma-peroxidázzal (HRP) jelölt TGC839(26-34)-peptid előállítása

A 10. példában előállított TGC839(26-34)-peptidet HRP-vel (enzimes immunteszthez való reagens, Boehringer Mannheim) keresztkötöttük, majd a terméket enzimes immunteszthez (EIA) jelölt antigénként alkalmaztuk. Ehhez tehát 11,6 mg HRP-t feloldottunk 0,95 ml 0,1 M foszfátpufferben (pH 6,7), majd az oldathoz 50 µl, 1,2 mg GMBS-t tartalmazó DMF-et adtunk, majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A reakcióelegyet 0,1M foszfátpufferrel (pH 6,5) ekvilibrált Sephadex G-25 oszlopon frakcionáltuk. Az így kapott maleimidált HRP-hez (27 mg) 0,38 mg TGC839(26-34)-peptidet (ld. 10. példa) adtunk, majd 1 napig 4°C-on inkubáltuk. A reakcióelegyet ezután 0,1 M foszfátpufferrel (pH 6,5) ekvilibrált Ultrogel AcA54 (Pharmacia) oszlopon frakcionáltuk, így kaptuk a HRP-jelölt TGC839(26-34)-peptidet.

14. példa

Antitesttiter meghatározás TGC839(26-34)-peptiddel immunizált egerek antiszérumból

Egér antiszérumokból az alábbiak szerint antitest-titert határoztunk meg. Az anti-egér immunglobulin antitesttel fedett mikrolemezek előállításához 100 µg/ml kecske anti-egér immunglobulin antitestet (IgG-frakció, Kappel)

tartalmazó 0,1 M karbonátoldatot (pH 9,6) 100 µl-es adagokban 96 lyukú mikrotiterlemezek lyukaiba pipettáztunk és 24 órán át 4°C-on inkubáltuk. A lemezeket ezután sós foszfátpufferrel (PBS, pH 7,4) mostuk, majd a lyukakban lévő szabad kötőhelyek blokkolásához 25% BlockAce-t (Snow Brand Milk Products) és 0,1% NaN₃-ot tartalmazó PBS-t (pH 7,2) 300 µl-es adagokban a lyukakba pipettáztunk, és legalább 24 órán át inkubáltuk.

Az így előállított anti-egér immunglobulin antitesttel fedett mikolemezek lyukaiba 100-100 µl, EC-pufferrel [0,2% BSA-t, 0,4 M NaCl-ot, 0,4% BlockAce-t, 0,5% CHAPS-ot {(3-(3-kolamidopropil)dimetilammónio)propánszulfonsav}, 2 mM EDTÁ-t és 0,1% NaN₃-ot tartalmazó 0,02 M foszfátpuffer, pH 7,0] hígított egér antiszérumot pipettáztunk, majd 16 órán át 4°C-on inkubáltuk. A lemezeket ezután PBS-sel (pH 7,4) mostuk, majd minden lyukba 100 µl, a 13. példában előállított, C-pufferben [1% BSA-t, 0,4 M NaCl-ot és 2 mM EDTÁ-t tartalmazó 0,02 M foszfátpuffer, pH 7,0] hígított, HRP-jelölt TGC839(26-34)-peptidet pipettáztunk, majd 7 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A lemezeket ezután PBS-sel (pH 7,4) mostuk, majd 100 µl TMB mikorlemez peroxidáz szubsztrát rendszer (Kirkegaard & Perry Lab., forgalmazó: Funakoshi Yakuhin) hozzáadásával megmértük minden egyes szilárd fázis enzimaktivitását. 10 perces szobahőmérsékleten történő inkubálás után a reakciót 100 µl 1 M foszforsav hozzáadásával állítottuk le, majd lemezleolvasóban (MTP-120, Corona) megmértük a 450 nm-es abszorbanciát (Abs. 450). Az eredmények a 7. ábrán láthatók. Mind a 8 immuni-

zált egerben nőtt a TGC839(26-34)-peptidre specifikus antitestek titere.

15. példa

TGC839(26-34)-peptidre specifikus monoklonális antitest előállítása

A viszonylag magas antitesttitert mutató 3. és 8. egeret 240 µg immunogénnel [TGC839(26-34)-peptid-BTG] intravénásan még egyszer immunizáltuk. Az utolsó immunizálás után 4 nappal kivágtuk az egerek lépét és nyomás alatt filtráltuk egy rozsdamentes acélhálón, majd a sejtekből Eagle-féle minimális esszenciális tápközegben (MEM) lebegő tenyészetet készítettünk. Az így kapott lépsejtszuspenziót BALB/C-egerekből származó P3-X63.Ag8.U1 (P3U1) mielómasejtekkel [Current Topics in Microbiology and Immunology 81, 1 (1978)] fuzionáltattuk. A sejtfúziót az eredeti eljárás [Nature 256, 495 (1975)] szerint végeztük. Ennek során tehát a lépsejteket és a P3U1-sejteket külön-külön háromszor mostuk szérummentes MEM-mel, majd 6,6:1 arányban összekevertük a lépsejteket és a P3U1-sejteket. Az elegyet a sejtek kiülepítése céljából 750 rpm-en 15 percig centrifugáltuk. A felülúszó megfelelő eltávolítása után a sejttöledéket óvatosan darabokra törtük, majd 0,3 ml 45%-os polietilénglikol (PEG) 6000-et (Koch-Light) adtunk hozzá és a fúziót úgy végeztük, hogy az elegyet 37°C-os vízfürdőn 7 percig inkubáltuk. A fúzió után a sejtekhez fokozatosan MEM-et adagoltunk, majd amikor már mind a 15 ml-t hozzáadtuk, az elegyet 750 rpm-en 15 percig centrifugáltuk és eltávolítottuk a felülúszót. A sejttöledéket 10% fetális bor-

júszérumot tartalmazó GIT-tápközegben (Wako Pure Chemicals) (GIT-10% FCS) 2×10^5 P3U1-sejt per ml koncentrációban fel-szuszpendáltuk, majd a sejtszuszpenziót 1 ml-es adagokban 24 lyukú multiedények (Linbro) összesen 168 lyukába osztot-tuk szét. A sejteket ezután 5%-os széndioxid inkubátorban 37°C -on inkubáltuk. Huszonnégy óra múlva mindegyik lyukhoz 1 ml, HAT-ot (1×10^{-4} M hipoxantint, 4×10^{-7} M aminopterint és $1,6 \times 10^{-3}$ M timidint) tartalmazó GIT-10% FCS tápközeget adtunk, így elindítottuk a HAT-szelektív te-nyészetést. A HAT-szelektív tenyészetést úgy folytattuk, hogy az inkubálás utáni 4. és 7. napon a régi tápközeg 1 ml-ét 1 ml HAT-tápközegre cseréltük. A hibridómák proliferációját a sejtfúziót követő 9. napon figyeltük meg és összegyűjtöttük a felülúszót.

A tenyészet felülúszójának antitestttiterét a 14. pél-dában ismertetett eljárás bizonyos módosításokkal való al-kalmazásával határoztuk meg. Ennek során tehát az anti-egér immunglobulin antitesttel fedett mikrolemezek lyukaiba 100 μl tenyészet felülúszót és 100 μl , C-pufferben 200-szor meghígított HRP-jelölt TGC839(26-34)-peptidet pipettáztunk, majd a lemezeket 4°C -on éjszakán át inkubáltuk. A lemezeket ezután PBS-sel mostuk, majd a 14. példában ismertetett el-járással megmértük az egyes szilárd fázisok enzimaktivitá-sát. A 168 lyuk közül azt a 60 lyukat, amelyben pozitív antitestttitert mértünk, kiválasztottuk, mint hibridómákat és fagyasztva tároltuk őket. Ezt követően összesen 9 - a 39., az 53., a 61., a 76., a 85., a 112., a 128., a 139. és a 151. számú - lyuk hibridómáit a hígítási eljárással

megklónoztuk. A klónozás során tápláló sejtként minden lyukhoz 5×10^5 BALB/C-egér tímuszsejtet adtunk. A klónozás után az egyes tenyészetek felülúszóinak antitesttiterét a fentivel azonos módon meghatároztuk, amelynek eredményeként a 39. számú hibridómából származó 20 lyuk közül 6 lyukban kaptunk pozitív klónokat, az 53. számú hibridómából származó 20 lyuk közül 2 lyukban, a 61. számú hibridómából származó 20 lyuk közül 5 lyukban, a 76. számú hibridómából származó 20 lyuk közül 9 lyukban, a 85. számú hibridómából származó 20 lyuk közül 8 lyukban, a 112. számú hibridómából származó 40 lyuk közül 3 lyukban, a 128. számú hibridómából származó 50 lyuk közül 13 lyukban, a 139. számú hibridómából származó 30 lyuk közül 2 lyukban és a 151. számú hibridómából származó 20 lyuk közül 4 lyukban.

E klónok közül a TGC839(26-34)-peptidre specifikus monoklonális antitestet termelő hibridómaként a következőket választottuk ki: 39-35. számú, 53-16. számú, 61-2. számú, 76-12. számú, 85-16. számú, 112-3. számú, 128-18. számú, 139-26. számú és 151-2. számú.

16. példa

A monoklonális antitestek osztály- és alosztály-meghatározása

A 14. példában ismertetett eljárás szerint anti-nyúl IgG antitesttel fedett mikrolemezeket készítettünk. Ennek során tehát 100 µg/ml kecske anti-nyúl immunglobulin antitestet (IgG-frakció, Kappel) tartalmazó 0,1 M karbonát-oldatot (pH 9,6) 100 µl-es adagokban 96 lyukú mikrotiterlemezek lyukaiba pipettáztunk és 24 órán át 4°C-on

inkubáltuk. A lemezeket ezután sós foszfátpufferrel (PBS, pH 7,4) mostuk, majd a lyukakban lévő szabad kötőhelyek blokkolásához 25% BlockAce-t (Snow Brand Milk Products) és 0,1% NaN_3 -ot tartalmazó PBS-t (pH 7,2) 300 μl -es adagokban a lyukakba pipettáztunk, és legalább 24 órán át inkubáltuk. Ezt követően 50 μl EC-puffert és 100 μl altípus-specifikus antitestet (a Bio-Rad által gyártott izotipizáló reagenskészlet része) adtunk az anti-nyúl IgG antitesttel fedett mikrolemezekhez, és 4°C-on 1 napig inkubáltuk. A lemezeket PBS-sel (pH 7,4) mostuk, majd hozzájuk adtuk az fenti hibridómatenyészetek felülúszóit és 4°C-on 1 napig inkubáltuk. A lemezeket PBS-sel (pH 7,4) mostuk, majd minden lyukba 100-100 μl -t pipettáztunk a 13. példában előállított HRP-jelölt TGC839(26-34)-peptid C-pufferben készített 400-szoros hígításából és szobahőmérsékleten 6 órán át inkubáltuk. A lemezeket PBS-sel (pH 7,4) mostuk, majd a 14. példában ismertetett eljárással megmértük az egyes szilárd fázisok enzimaktivitását. Ennek eredménye szerint a fenti hibridómák által termelt monoklonális antitest osztálya és alosztálya a következő: 39-35. számú: IgG3; 53-16. számú: IgG3; 61-2. számú: IgG2a, λ ; 76-12. számú: IgG3; 85-16. számú: IgG2b, κ ; 112-3. számú: IgG1; 128-18. számú: IgG1, κ ; 139-26. számú: IgG1; és 151-2. számú: IgG2a.

17. példa

Kompetitív EIA

Az egyes kiválasztott monoklonális anti-TGC839(26-34)-peptid antitestek TGC839(26-34)-peptiddel szembeni reaktivitását kompetitív EIA-val vizsgáltuk. Először a 14.

példában ismertetett eljárással minden monoklonális antitestet tartalmazó tenyészet felülúszóból meghatároztuk az antitesttitert, majd meghatároztuk a kompetitív EIA-hoz használandó antitestkoncentrációt. Ezt követően az anti-egér immunglobulin antitesttel fedett mikrolemezek lyukaiba 50 µl, C-pufferrel a kívánt koncentrációra hígított antitestoldatot, 50 µl, C-pufferben meghígított (0, 0,156, 0,625, 2,5, 10 vagy 40 ng/ml) TGC839(26-34)-peptidet, és 50 µl HRP-jelölt TGC839(26-34)-peptidet (C-pufferben elkészített 1500-szoros hígításban) pipettáztunk, majd 4°C-on 1 napig inkubáltuk. A lemezeket ezután PBS-sel (pH 7,4) mostuk, majd a 14. példában ismertetett eljárással megmértük az egyes szilárd fázisok enzimaktivitását. Az eredmények a 8. ábrán láthatók. A monoklonális antitestek HRP-jelölt TGC839(26-34)-peptidhez való kötődését 40 ng/ml TGC839(26-34)-peptid 33% és 92% közötti mértékben gátolta, így megállapítottuk, hogy ezek az antitestek ténylegesen reagálnak a TGC839(26-34)-peptiddel. Különösen a 128-18. és a 112-3. számú antitestek mutattak magas affinitást, mivel a B/B_0 -értékben [az egyes antitestekhez kötött HRP-jelölt TGC839(26-34)-peptid jelöletlen TGC839(26-34)-peptid jelenlétében mért mennyisége osztva az egyes antitestekhez kötött HRP-jelölt TGC839(26-34)-peptid jelöletlen TGC839(26-34)-peptid távollétében mért mennyiségével] kifejezett 50%-os kötési gátlás a 128-18. számú antitest esetében 2 ng/ml, a 112-3. számú antitest esetében 7 ng/ml volt.

18. példa

Hibridóma expresszió egerek aszciteszfolyadékában

Megkíséreltük a 128-18. és a 112-3. számú hibridómákat egerek aszciteszfolyadékában expresszáltatni. Előzőleg intraperitoneálisan 0,5 ml paraffinolajjal kezelt egereknek (BALB/C, nőstény) intraperitoneálisan beadtuk a két hibridóma valamelyikét ($1-3 \times 10^6$ sejt/állat mennyiségben), majd 6-20 nap múlva aszciteszfolyadékot gyűjtöttünk. Az aszciteszfolyadék-mintákból protein-A oszlopon tisztítottuk meg a monoklonális antitesteket. Ennek során körülbelül 25 ml aszciteszfolyadék-mintákhoz azonos térfogatú kötőpuffert (3,5 M NaCl-ot és 0,05% NaN_3 -ot tartalmazó 1,5 M glicin, pH 9,0) adtunk, felvittük egy előzőleg kötőpufferrel ekvibrált rekombináns protein-A agaróz oszlopra (Repligen, majd a specifikus antitest elúciós pufferrel (0,05% NaN_3 -ot 0,1 M citrátpuffer, pH 3,0) eluáltuk. Az eluátumot 4°C-on 2 napig PBS-sel (pH 7,4) szemben dializáltuk, majd 0,22 μm -os filteren (Millipore) sterilen filtráltuk és 4°C-on vagy -80°C-on tároltuk. Az így kapott monoklonális antitesteket 128-18 és 112-3 antitesteknek neveztük el.

19. példa

TGC838-eredetű részpeptideket felismerő nyúl antiszérumok előállítása

A TGC838-fehérje 25 aminosav hosszúságú, $\text{Tyr}_{166}\text{-Cys}_{199}$ (az első aminosav a transzlációiniciációs kodonnak megfelelő Met-től) részpeptidjének megfelelő peptidet ugyanúgy szintetizáltuk, mint a 10. példában előállított peptidet.

Ezt követően a kapott peptid 8,2 mg-ját N-(6-maleimido-kaproiloxi)szukcinimid segítségével 19,7 mg kürtőscsiga-hemocianinhoz ("keyhole limpet hemocyanine") konjugáltuk (puffer: 8 M ureát és 0,9% NaCl-t tartalmazó 20 mM foszfátpuffer, pH 7,4; inkubálás: 15 óra, szobahőmérséklet). Az így kapott konjugátummal, több adagban, adjuváns jelenlétében, szubkután úton nyulakat immunizáltunk. Az immunizálást követően vérmintákat vettünk, majd ezeket a korpuszkuláris összetevők eltávolítása érdekében lecentrifugáltuk, és így kaptuk az antiszérumot.

20. példa

Egy TGC838 expressziós vektor előállítása

Előállítottunk egy expressziós vektort a humán TGC838-fehérje állati sejtekben történő expresszáltatásához. Első lépésben a TGC838-fehérjét kódoló cDNS-fragmenst alkalmazva templátként PCR-t végeztünk az alábbi szintetikus DNS-ekkel: egy szintetikus DNS, amely egy EcoRI restrikciós helyet visz be közvetlenül az ATG transzlációiniciációs kodontól 5'-irányba [5' GCGCTGAATT CCCACCATGG CAGCAGCCGC CGCTACCAAG ATCCTTCTGT GCCTCCCGCT TCT 3': 7. azonosítószámú szekvencia]; és egy szintetikus DNS, amely közvetlenül a terminációs kodontól 3'-irányban egy NotI restrikciós helyet visz be [5' TTGCGGCCGC TCAGATGCCA GGGAGGATGA AGCAGGGGAG GATGATG 3': (9. azonosítószámú szekvencia)], aminek eredményeként egy, a TGC838 ORF-jét tartalmazó DNS-fragmenst kaptunk. Ezt a DNS-fragmenst EcoRI és NotI restrikciós enzimekkel emésztettük, majd beillesztettük egy pCAN618 EcoRI-NotI helyére, így kaptuk a

pCAN618/H838 expressziós vektort, amelynek segítségével állati sejtekben expresszálhatjuk a humán TGC838-fehérjét.

21. példa

A TGC838 és a TGC839-fehérjék expresszáltatása COS-7 sejtekben

10% FBS-t (fetális szarvasmarha szérumit) tartalmazó DMEM-tápközegben (Gibco BRL) 6 lyukú lemezekben 24 órán át COS-7 sejteket (4×10^5 sejt/lyuk) inkubáltunk. A sejtekbe ezután LipofectAMINE (Gibco BRL) alkalmazásával bevittük a 20. példában kapott pCAN618/H838 DNS-t, a 3. példában kapott pCAN618/H838F DNS-t vagy a 7. példában kapott pCAN618/H839F DNS-t, majd 18 órán át inkubáltuk. Ezt követően a tápközeget 0,05% CHAPS-ot tartalmazó Opti-MEM-re (Gibco BRL) cseréltük, majd újabb 24 órán át inkubáltuk. Levettük az egyes tenyészetek felülúszóját és centrifugálással eltávolítottuk belőlük a lebegő sejteket, majd ebben a formában vagy ultrafiltrálással történő töményítés után (Centricon-10; Amicon) meghatároztuk az expressziós terméket.

22. példa

A TGC838-fehérje expressziója CHO-K1 sejtekben

Kalcium-foszfát koprecipitációs eljárással a TGC838-fehérje expressziós vektorát bevittük CHO-K1-sejtekbe. Első lépésben 1×10^5 CHO-K1 sejtet 24 órán át egy 10 cm-es edényben, 10% FBS-t tartalmazó Ham-féle F12-tápközegben (Gibco BRL) inkubáltunk. Ettől külön, a 20. példában kapott pCAN618/H838 DNS-t CellPhect Transformation reagenskészlet (Pharmacia) segítségével kalcium-foszfáttal koprecipitál-

tuk, majd a koprecipitátumot hozzáadtuk a fenti CHO-K1 sejtekhez. 12 órás inkubálás után a sejteket kétszer 5 ml (FBS-mentes) Ham-féle F12-tápközeggel mostuk, 3 ml glicerinsoldatot [15% glicerins, 150 mM NaCl, 20 mM HEPES (pH 7,4)] adtunk hozzá és az elegyet 3 percig inkubáltuk. A sejteket ezután egyszer 5 ml (FBS-mentes) Ham-féle F12-tápközeggel mostuk, majd 10% FBS-t tartalmazó Ham-féle F12-tápközeget adtunk hozzá és további 36 órán át inkubáltuk. A tápközeget ekkor 500 µg/ml Geneticint (Wako Pure Chemical) és 10% FBS-t tartalmazó Ham-féle F12-tápközegre cseréltük, majd újabb 24 órán át inkubáltuk. Ezt követően a korlátozó hígításos eljárással egyetlen sejtből származó expressziós sejtklónokat állítottunk elő, amelynek során 96 lyukú lemezekben 500 µg/ml Geneticint és 10% FBS-t tartalmazó Ham-féle F12-tápközegben különböző hígítási arányokban inkubáltuk a sejteket. Így előállítottunk egy egyetlen sejtből származó, TGC838-fehérjét expresszáló CHO-K1 sejtvonalat, a CHO-K1/TGC838N-4-et. A CHO-K1/TGC838N-4 tenyészet felülúszóját 24 órával azután vettük le, hogy a tápközeget 0,05% CHAPS-ot tartalmazó Opti-MEM-re cseréltük, a logaritmikus sejtnövekedési fázisban. A felülúszóból centrifugálással eltávolítottuk a lebegő sejteket, majd meghatároztuk az expressziós terméket.

23. példa

A TGC839-fehérje expressziója CHO-K1 sejtekben

CHO-K1 sejtekbe a 22. példában alkalmazottal azonos módon, kalcium-foszfát koprecipitációs eljárással bevittük a TGC839-fehérje expressziós vektorát. A 3. példában kapott

pCAN618/H839F DNS-t 10 cm-es edényekben tenyésztett CHO-K1 sejtekbe vittük be, majd a szelektálást Geneticin alkalmazásával végeztük. A kinövő sejtekből az expressziós sejteket először kolóniaszelektálással szelektáltuk ki, majd a korlátozó hígításos eljárással előállítottunk egy egyetlen sejtől származó, a TGC839-fehérjét expresszáló sejt vonalat a CHO-K1/618/839F6-3-at. A CHO-K1/618/839F6-3 tenyészet felülúszóját ugyanolyan módon vettük le, mint a 22. példában.

24. példa

A TGC838 és a TGC839-fehérje Western-blot analízise

A 21-23. példában kapott tenyészetek felülúszóihoz (a pCAN618/H838 vagy pCAN618/H838F DNS-t, vagy a pCAN618/H839F DNS-t tartalmazó expressziós vektorokat tartalmazó COS-7 vagy CHO-K1 sejtek tenyészetének felülúszója) 2-merkaptoetanolt tartalmazó SDS-mintapuffert adtunk, majd az elegyeket Peptide-PAGE-n (Tefco) elektroforetizáltuk, végül elektromosan PVDF-membránokra (Amersham) vittük át. Első antitestként a 19. példában kapott nyúl antiszérumot (2000-szeres hígítás), a 12. példában kapott egér antiszérumot (50000-szeres hígítás), a 18. példában kapott egér IgG-t (2 µg/ml) vagy anti-FLAG egér IgG-t (10 µg/ml; Sigma) alkalmaztunk, második antitestként pedig HRP-vel (tormaperoxidázzal) jelölt anti-egér IgG antitestet (2000-szeres hígítás; Amersham) vagy HRP-jelölt anti-nyúl IgG antitestet (2000-szeres hígítás; Amersham) alkalmaztunk. A színelőhíváshoz ECLplus Western-blot detektálási rendszert (Amersham) alkalmaztunk. Ennek eredményeként megállapítottuk, hogy a TGC838 és a TGC839-fehérje a tenyészet felül-

úszójába szekretálódik (9. ábra). Megállapítottuk továbbá azt is, hogy a pCAN618/H838 vagy pCAN618/H838F DNS-t tartalmazó COS-7 sejtek tenyészetének felülúszóiban a szekréciós termékek elektroforetikus mobilitása megegyező, és mivel ezek FLAG-peptidek elleni, specifikus antitestekkel nem detektálhatók, azt is megállapítottuk, hogy a TGC838-fehérje egy C-terminális processzálas eredményeként keletkező termék formájában szekretálódik (10. és 11. ábra).

25. példa

Immunprecipitáció TGC838 és TGC839-fehérjére specifikus antitestekkel

Portein-G Sepharose-t (10 μ l; Pharmacia) 30 percig TBS-T/BSA-val [25 mM Tris-HCl (pH 7,2), 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, 0,01% BSA] kezeltünk, majd TBS-T/BSA-ban hígított 10 μ l egér IgG-t vagy 5 μ l nyúl antiszérumot adtunk hozzá és 2 óráig inkubáltuk. Ezt követően háromszor mostuk TBS-T/BSA-val, majd hozzáadtuk a 21. példában kapott tenyészet felülúszóját (pCAN618/H838F DNS expressziós vektort vagy pCAN618/H839F DNS expressziós vektort tartalmazó COS-7 sejtek tenyészetének felülúszója, ultrafiltrálással betöményítve), majd 2 órán át inkubáltuk. Ezt követően 4-szer mostuk TBS-T/BSA-val, SDS-mintapuffert adtunk hozzá, majd a megkötött fehérjét 90°C-on 2 percig eluáltuk. Az eluátumhoz azonos térfogatnyi, 2-merkaptoetanolt tartalmazó SDS-mintapuffert adtunk, majd az elegyet Peptide-PAGE-n (Tefco) elektroforetizáltuk, elektromosan PVDF-membránokra (Amersham) vittük át, végül Western-blottal analizáltuk (12. ábra). Első antitestként egér antiszérumot (8. számú

egér; ld. a 14. példában), második antitestként pedig HRP-jelölt anti-egér IgG antitestet (2000-szeres hígítás) alkalmaztunk. A színelőhíváshoz EDLplus Western-blot detektálási rendszert (Amersham) alkalmaztunk.

26. példa

A TGC838 és a TGC839-fehérjéhez történő cukorlánc-hozzáadás ellenőrzése

A TGC838 és a TGC839-fehérje aminosavszekvenciája alapján várható, hogy két különböző típusú N-glikozilációs helyhez adódnak hozzá cukorláncok. Ennek ellenőrzésére enzimés kezelést alkalmaztunk, hogy így eltávolítsuk a cukorláncokat. A 21. példában a COS-7 sejtek tenyészetéből kapott felülúszót ultrafiltrálással 10-szeresére töményítettük, majd N-glikozidáz F deglikozilációs reagenskészlet (Boehringer) alkalmazásával eltávolítottuk a cukorláncokat. A reakcióterméket ultrafiltrálással betöményítettük, majd a 24. példában leírtakkal azonos módon Western-blottal analizáltuk. Ennek eredményeként megállapítottuk, hogy mind a TGC838, mind pedig a TGC839-fehérje kisebb, 10 kDa-os molekulasúlynál jelent meg, ami egyértelműen jelzi az N-típusú cukorlánc hozzáadódást (13. ábra).

27. ábra

Humán kondroszarkóma sejtvonal (SW1353) tenyésztése és a felülúszó kinyerése

SW1353 sejteket 10% FBS-t tartalmazó L15-tápközegben (ICN Biochemicals) logaritmikus fázisig szaporítottunk, majd levettük a tenyészet felülúszóját. A lebegő sejteket

centrifugálással távolítottuk el, majd a felülúszóban ellenőriztük az expressziós terméket.

28. példa

Anti-TGC839FLAG monoklonális antitestet alkalmazó EIA-rendszer kifejlesztése

A TGC839FLAG-et az alábbiak szerint állítottuk elő. A 23. példában kapott TGC839FLAG-termelő CHO-K1/618/839F6-3 sejtek tenyészetének felülúszójából, üregesszálas eszköz ("hollow fiber device") segítségével, 1000 ml-t 20 ml-re töményítettünk. A koncentrátumhoz 1/10 mennyiségű, 1,5 M NaCl-ot tartalmazó 500 mM MOPS-puffert (pH 7,5) adtunk, majd az elegyet a TGC839FLAG kikötése érdekében 150 mM NaCl-ot tartalmazó 50 mM MOPS-pufferrel (pH 7,5) ekvibrált, 5 ml anti-FLAG M2 affinitásgélre (Sigma) vittük fel. A gelet ezután alaposan átmostuk 150 mM NaCl-ot tartalmazó 50 mM MOPS-pufferrel (pH 7,5), majd a TGC839FLAG fehérjét 100 mM glicin-HCl pufferrel (pH 3,5) eluáltuk. A TGC839FLAG-et tartalmazó eluátumot ezután 1 M Tris-HCl pufferrel (pH 9,0) semlegesítettük és Centricon-30 cső (Amicon) segítségével 1 ml-re töményítettük. A tisztított minta fehérjetartalmát BCA-fehérjemeghatározó reagens (PIERCE) segítségével határoztuk meg. Ennek eredményeként azt kaptuk, hogy 1000 ml tenyészet felülúszóból körülbelül 500 µg TGC839FLAG-et nyertünk ki.

Az anti-TGC839FLAG monoklonális antitesteket termelő sejteket ugyanúgy állítottuk elő, mint a 15. példában. Ennek során egy egeret a fenti eljárással tisztított TGC839FLAG-gel immunizáltunk. Ezt követően az egerből szár-

mazó lépsejteket P3X63Ag8U.1 egér mielómasejtekkel fuzionáltattuk, és így kaptuk a hibridómákat. A TGC839FLAG-re specifikus antitesttitert mutató klónok közül, a 839-01. számú monoklonális antitestet termelő 839-01-es hibridómát és a 839-02. számú monoklonális antitestet termelő 839-02-es hibridómát választottuk ki, mint anti-TGC839FLAG monoklonális antitestet termelő hibridómákat.

Az alábbiak kifejlesztettünk egy olyan EIA-rendszert, amelyhez egy anti-TGC839FLAG monoklonális antitestet használunk. Ennek során 3,2 mm-es polisztirolgyöngyöket (Immunochemical) éjszakára 4°C-on, 839-01. számú anti-TGC839FLAG monoklonális antitestet (20 µg/ml) tartalmazó 50 mM MOPS-pufferbe (pH 7,5) áztattunk, majd háromszor mostuk 1% BSA-t tartalmazó 50 mM MOPS-pufferrel (pH 7,5). A gyöngyöket ezután 1% BSA-t tartalmazó 50 mM MOPS-pufferbe (pH 7,5) áztattuk és még egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. Így kaptuk az anti-TGC839FLAG monoklonális antitesteket tartalmazó gyöngyöket.

Ettől külön a 839-02. számú anti-TGC839FLAG monoklonális antitestet a szokásos eljárás [ld. Eiji Ishikawa: Koso Hyosoki Ho (Methods of Enzyme Labeling)", Gakkai Shuppan Center, 1991, 62. oldal] alkalmazásával peroxidázzal (POD, Roche) jelöltük.

A TGC839FLAG meghatározása a fentiek szerint előállított reagensek és egy teljesen automatikus kemilumineszcenciás enzimes immunológiai vizsgálati berendezés, a *Spherelight 180* (Olympus Optical Co.) segítségével történt. Ennek során a fenti vizsgálati berendezésben az egyik típu-

sú fenti anti-TGC839FLAG monoklonális antitestet tartalmazó gyöngyökhöz olyan 50 µl mennyiségű standard TGC839FLAG-oldatot adtunk, amelynek koncentrációját egy előre meghatározott értékre állítottuk be, valamint 90 µl, 2% BSA-t tartalmazó 50 mM MOPS-puffert (PH 7,5) is adtunk hozzá. A reakció után kivettük a „labdát” („ball”) és fiziológiás sóoldattal mostuk. Ezután 140 µl POD-jelölt anti-TGC839FLAG monoklonális antitestet adtunk hozzá olyan oldat formájában, amelynek koncentrációját előzőleg 2% BSA-t tartalmazó 50 mM MES-pufferben (pH 6,5) 5 µg/ml-re állítottuk, majd az elegyet 37°C-on 7 percig inkubáltuk. A „labdát” fiziológiás sóoldattal mostuk, majd 140 µl, 5 mM luminolt és 0,02% hidrogén-peroxidot tartalmazó 50 mM Tris-HCl puffert (pH 8,5) adtunk hozzá és mértük az emittanciát (cps) (1. táblázat). Az így kapott munkagörbe a 14. ábrán látható.

1. táblázat

TGC839FLAG koncentráció (ng/ml)	Emittancia (cps)
0,01	6834
0,1	48003
1	565938
10	5909534
100	37024872

Ezt követően az így kialakított EIA-rendszer alkalmazásával meghatároztuk a TGC838 mennyiségét különböző sejtvonalak tenyészeinek felülúszóiból, valamint egészséges alanyoktól és rákos betegektől vett plazmamintákban. A CHO-K1/TGC838N-4 és a COS7/TGC838 sejtek tenyészeinek felülúszóit az alábbi módon állítottuk elő. A 22. példában kapott CHO-K1/TGC838N-4 sejteket 6 lyukú lemezekben nem teljes összefolyásig („confluency”) tenyésztettük, majd a tenyészfolyadékot 0,05% CHAPS-ot tartalmazó Opti-MEM-re (Lifetech Oriental) cseréltük és 2 napig inkubáltuk. A COS7/TGC838 sejtek tenyészeteinek felülúszóját a 21. példában leírtak szerint állítottuk elő. Az SW1353 sejtek tenyészeteinek felülúszóját azután vettük le, hogy a sejteket 10% fetális szarvasmarha-szérummal kiegészített MEM-tápközegen nem teljes összefolyásig tenyésztettük. Meghatároztuk a TGC838 mennyiségét egészséges alanyok [5 férfi (M) és 3 nő (F)], valamint rákos betegek [5 májsejt-karcinómás beteg (HCC), 3 vastagbélrákos beteg] plazmamintáiban is. Az eredményeket a 2., 3. és 4. táblázat, valamint a 15. és 16. ábra mutatja, ahol az egészséges alanyok és a rákos betegek plazmájának TGC838-tartalmát 490 nm-es abszorbanciában adtuk meg. A különböző sejtenyészetek felülúszóiban mért TGC838-tartalmakat egy, a tisztított rekombináns TGC838-fehérje tartalmát kontrollként alkalmazva előállított munkagörbe alapján kidolgozott értékekben kifejezve adjuk meg.

2. táblázat

Szám	abszorbancia		átlag
M1	0,028	0,027	0,028
M2	0,021	0,019	0,020
M3	0,021	0,019	0,020
M4	0,028	0,030	0,029
M5	0,039	0,035	0,037
F1	0,034	0,036	0,035
F2	0,024	0,022	0,023
F3	0,024	0,028	0,026
átlag	-		0,027

3. táblázat

Szám	abszorbancia		átlag
HCC-1	0,067	0,070	0,069
HCC-2	0,070	0,063	0,067
HCC-3	0,083	0,078	0,081
HCC-4	0,090	0,098	0,093
HCC-4	0,125	0,131	0,128
Vastagbél-1	0,024	0,030	0,027
Vastagbél-2	0,126	0,124	0,125
Vastagbél-3	0,081	0,100	0,091
átlag	-		0,085

4. táblázat

Tenyészet felülűszó	TGC838 (ng/ml)
CHO-K1/TGC838N-4 eredeti	111,04
CHO-K1/TGC838N-4 10-szeres	10,75
CHO-K1/TGC838N-4 100-szoros	1,06
COS7/TGC838 eredeti	133,21
COS7/TGC838 10-szeres	10,38
COS7/TGC838 100-szoros	0,98
SW1353(humán kondroszarkóma sejtvonall)-1 eredeti	10,58
SW1353(humán kondroszarkóma sejtvonall)-1 10-szeres	0,93
SW1353 (humán kondroszarkóma sejtvonall)-1 100-szoros	0,07
SW1353(humán kondroszarkóma sejtvonall)-2 eredeti	16,29
SW1353(humán kondroszarkóma sejtvonall)-2 10-szeres	1,32
SW1353 (humán kondroszarkóma sejtvonall)-2 100-szoros	0,11

29. példa

A TGC839-fehérjét kötő sejtek azonosítása FACS alkal-
mazásával

(1) Korpuszkuális formájú sejtek előállítás

Humán perifériás vérből fajsúly-centrifugálással korpuszkuális formájú sejteket állítottunk elő. 0,1% EDTA-dinátriúmsót tartalmazó humán perifériás vért (40 ml) azonos térfogatú PBS-sel meghígítottunk. 15 ml-es centrifugacsövekbe 3,5-5 ml-es adagokban Ficoll-Paque PLUS-t [Amersham Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Svédország); 17-1440-02] tettünk, majd a hígított vérmintát 7 ml-es adagok-

ban rájuk rétegeztük. Minden csőben elválasztottunk egy limfocitákból és monocitákból álló korpuszkuális formájú réteget, majd 30 perces, $400 \times g$ -n történő centrifugálással nyertük ki. Az így kapott korpuszkuális formájú sejtekhez 3 tárfogat PBS-t adtunk, az elegyet lecentrifugáltuk, majd az így mosott sejteket kinyertük, újra háromszor PBS-sel mostuk és megint kinyertük.

(2) A kapott korpuszkuális formájú sejtek festése

Minden 2×10^6 korpuszkuális formájú sejthez $100 \mu\text{l}$ mosóoldatot (PBS/0,1% NaN_3 /1% FBS) adtunk, amely $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ mennyiségben TGC839FLAG fehérjét vagy csak mosóoldatot (negatív kontroll) tartalmazott, és a kapott szuszpenziót 1 órán át 4°C -on inkubáltuk. Ezt követően centrifugálással eltávolítottuk a reakcióközeget és a korpuszkuális formájú sejteket kétszer $500 \mu\text{l}$ mosóoldattal mostuk. Ezt követően eltávolítottuk a mosadékot, a sejtek felszuszpendálása céljából $100 \mu\text{l}$, $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ anti-FLAG M2 antitestet [Sigma (MO, USA); F-3165] tartalmazó mosóoldatot adtunk hozzá, 40 percig 4°C -on inkubáltuk, majd a sejteket kétszer $500 \mu\text{l}$ mosóoldattal mostuk. A sejtek felszuszpendálása céljából ezután $100 \mu\text{l}$, $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ FITC-jelölt kecske anti-egér immunglobulin antitestet [PharMingen (CA, USA); 12064D] adtunk hozzá, sötétben 40 percig 4°C -on inkubáltuk, majd a sejteket kétszer $500 \mu\text{l}$ mosóoldattal mostuk. A sejteket ezután $100 \mu\text{l}$ mosóoldatban felszuszpendáltuk, hozzáadtunk $20 \mu\text{l}$ PE-vel (fikoeritrinnel) jelölt anti-humán CD56 antitestet (B159) [PharMingen (CA, USA); 31665X] és keverés után sötétben 25 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A sejteket ezután

kétszer 1000 μ l mosóoldattal mostuk, majd 500 μ l mosóoldatban felfuszpendáltuk, a sejttörmeléket és hasonlókat sejtfilterrel eltávolítottuk, majd a sejteket FACS-analízissel vizsgáltuk.

(3) FACS-analízis

FACS-ként a Becton Dickinson (NJ, USA) által gyártott FACSScan-t használtunk, az analízishez szoftverként pedig a Becton Dickinson CellQuest szoftverjének 1.2.2 verzióját. Minden mért minta 1×10^5 sejtet tartalmazott.

A TGC839FLAG-fehérjéhez kötött sejtek számát (y-tengely) a FITC-intenzitás (x-tengely) függvényében ábrázolva kapott adatok elemzése alapján kiderült, hogy a TGC839FLAG fehérjét tartalmazó minta minden mért sejt esetében nagyobb számú FITC-festett sejtet adott, mint a TGC839FLAG fehérje hozzáadása nélkül készített negatív kontrollok. Így bizonyítottuk, hogy vannak TGC839-fehérjéhez kötött limfociták (17. ábra). Ez egyben arra is engedett következtetni, hogy a limfocitafrakcióban vannak TGC838-hoz kötődő sejtek is.

Minden mért sejt esetében megvizsgáltuk a sejteloszlást is. Ehhez az SSC-t (oldalfényszórási komponens) (y-tengely) a FITC-intenzitás (x-tengely) függvényében ábrázoltuk és impulzustartományra nézve szűrtük („gating”, kapuzás) a TGC839FLAG-hez kötött sejtek egy csoportját (R1). Az R1-sejtcsoporthoz azután a sejteloszlást úgy ellenőriztük, hogy ábrázoltuk a PE-intenzitás (y-tengely) a FITC-intenzitás (x-tengely) függvényében és a csoportot két további csoportra osztottuk: az R2-csoportba azok a sejtek

kerültek, amelyek kötődnek a TGC839FLAG-hez és expresszálják a CD56-ot, az R3-csoportba pedig azok a sejtek, amelyek kötődnek a TGC839FLAG-hez, de nem expresszálják a CD56-ot. Ennek eredményeként azt láttuk, hogy a TGC839FLAG-et kötő sejtek többsége expresszálja a CD56-ot, így megállapítottuk, hogy a TGC839 receptorai az NK-sejteken expresszálódtak (18. ábra és 5. táblázat). ez azt is valószínűsített, hogy a TGC838 receptorai is NK-sejteken expresszálódnak.

5. táblázat

		R1	R2	R3
TGC839FLAG fehérjét tartalmazó sejtcsoport	A pozitív sejtek száma a megvizsgált 10^5 sejt közül	119	117	2
	A pozitív sejtek aránya (%)	0,12	0,12	0,00
TGC839FLAG fehérje nélküli sejtcsoport	A pozitív sejtek száma a megvizsgált 10^5 sejt közül	61	61	0
	A pozitív sejtek aránya (%)	0,06	0,06	0,00

30. példa

A TGC839-fehérje hatásai NK-sejtek citotoxicitására

Friss humán perifériás vérből Ficoll-Paque (Pharmacia) alkalmazásával leukocitákat izoláltunk, majd ezekből egy MACS (Miltenyi Biotec) és egy NK-sejt izoláló reagenskészlet (Miltenyi Biotec) segítségével NK-sejteket

izoláltunk. A kapott sejteket 10% FBS-t és IL15-öt (50 ng/ml; R & D Systems) tartalmazó RPMI 1640 tápközegen 24 órán át inkubáltuk. Mosás után a sejteket további 16 órán át RPMI 1640 tápközegen (Gibco BRL) inkubáltuk, ami most 10% FBS-t, IL12-t (1 ng/ml; R & D Systems) és TGC839FLAG fehérjét (0-500 ng/ml) tartalmazott, majd mosás után megvizsgáltuk az effektorsejtek citotoxicitását. Célseljtként ^{51}Cr -mal jelölt K562 humán leukémia sejtvonalat (ATCC) alkalmaztunk. 5×10^6 K562-sejtet RPMI 1640 tápközeggel mostunk, majd 100 μCi [^{51}Cr] Na_2CrO_4 -ot (NEN) adtunk hozzá és a jelölést 1 órán át 37°C-on végeztük. A sejteket ezután mostuk és 1 órán át 10% FBS-t tartalmazó RPMI 1640 tápközegben inkubáltuk. A sejteke újra mostuk, majd 96 lyukú lemezekre osztottuk szét (10^4 sejt/lyuk). Ehhez adtuk hozzá 1-12-szeres mennyiségben a fenti effektorsejteket, majd 7 órán át inkubáltuk. A tenyészet felülúszójába felszabaduló radioaktivitást γ -számlálóban (Beckman) mértük és a citotoxicitást az alábbiak szerint számoltuk:

$$\text{citotoxicitás} = (\text{felszabadult radioaktivitás} - \text{spon-} \\ \text{tán felszabadult radioaktivitás}) / (\text{maximális felszabadult} \\ \text{radioaktivitás} - \text{spon-tán felszabadult radioaktivitás}) \times \\ 100\%$$

31. példa

A TGC839-fehérje hatása NK-sejtek és K562 sejtek proliferációjára

Humán perifériás vérből a 30. példában leírtakkal azonos módon NK-sejteket izoláltunk. A kapott sejteket 10% FBS-t és IL15-öt (50 ng/ml) tartalmazó RPMI 1640 tápközegen

24 órán át inkubáltuk, majd mostuk. Az NK-sejteket (10^5 sejt/lyuk) és a K562 sejteket (2×10^4 sejt/lyuk) 96 lyukú lemezekre pipettáztuk, majd 40 órán át 10% FBS-t, IL12-t (1 ng/ml) és TGC839FLAG fehérjét (0-500 ng/ml) tartalmazó RPMI 1640 tápközegen (Gibco BRL) inkubáltuk. Az utolsó 12 órában BrdU-val jelölést végeztünk, majd a sejtek proliferációját sejtproliferációs ELISA-készlet (Boehringer) segítségével ellenőriztük. A detektáláshoz a 450 nm-es abszorbanciát (λ_{450}) mértük (20. és 21. ábra).

Ezt követően a sejtek centrifugálással történő eltávolítása után Quantokine IFN- γ immunvizsgálari reagenskészlet (R&D Systems) mindegyik tenyészet felülúszójában megmértük az IFN- γ koncentrációját (22. ábra).

Az alábbiakban ismertetjük a találmány ipari alkalmazhatóságát.

A találmány szerinti fehérje vagy hasonlóak például sejtproliferációs aktivitással rendelkeznek, így szövetregeneráló szerként alkalmazhatók egy beteg szövet kivágása után. A találmány szerinti fehérje reagensként is alkalmazható olyan vegyület vagy sója szűréséhez, amely serkenti vagy gátolja a találmány szerinti fehérje aktivitását. Az ilyen szűréssel kapott inhibitor várhatóan alkalmazható lesz kezelésre vagy megelőzésre szolgáló szerként a különböző rákos betegségekhez (pl. méhtest rákja, endometrióma, emlőrák, vastagbélrák, prosztatatarák, tüdőrák, veserák, neuroblasztóma, hólyagrák, mielóma).

A találmány szerinti fehérjére specifikus antitestek specifikusan felismerhetik a találmány szerinti fehérjét így alkalmazható arra, hogy vizsgálandó oldatokban meghatározzuk a találmány szerinti fehérje mennyiségét, továbbá alkalmazható diagnosztikai szerként különböző rákos betegségek esetén (ld. fent). A találmány szerinti fehérjére specifikus humanizált antitest is alkalmazható kezelésre vagy megelőzésre szolgáló szerként különböző rákos betegségekhez (ld. fent).

SZEKVENCIALISTA

(210) 1
 (211) 252
 (212) PRT
 (213) Human
 (400) 1

Met Ala Ala Ala Ala Ala Thr Lys Ile Leu Leu Cys Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Ser Gly Trp Ser Arg Ala Gly Arg Ala Asp Pro His Ser
 20 25 30
 Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro Arg
 35 40 45
 Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr Phe Leu His Tyr
 50 55 60
 Asp Cys Gly Asn Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro Leu Gly Lys Lys
 65 70 75 80
 Leu Asn Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro Val Leu Arg Glu
 85 90 95
 Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Arg Asp Ile Gln Leu Glu Asn
 100 105 110
 Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys Glu
 115 120 125
 Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln Phe Ser Phe Asp
 130 135 140
 Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg Met Trp Thr Thr
 145 150 155 160

Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp Lys
165 170 175
Val Val Ala Met Ser Phe His Tyr Phe Ser Met Gly Asp Cys Ile Gly
180 185 190
Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr Leu Glu Pro Ser
195 200 205
Ala Gly Ala Pro Leu Ala Met Ser Ser Gly Thr Thr Gln Leu Arg Ala
210 215 220
Thr Ala Thr Pro Ser Ser Phe Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Pro Ala
225 230 235 240
Ser Ser Ser Leu Ala Ser Glu Glu Ser Pro Leu Glu
245 250 252

<210> 2

<211> 756

<212> DNS

<213> Human

<400> 2

ATGGCAGCAG CCGCCGCTAC CAAGATCCTT CTGTGCCTCC CGCTTCTGCT CCTGCTGTCC 60
GGCTGGTCCC GGGCTGGGCG AGCCGACCCT CACTCTCTTT GCTATGACAT CACCGTCATC 120
CCTAAGTTCA GACCTGGACC ACGGTGGTGT GCGGTTCAAG GCCAGGTGGA TGAAAAGACT 180
TTTCTTCACT ATGACTGTGG CAACAAGACA GTCACACCTG TCAGTCCCCT GGGGAAGAAA 240
CTAAATGTCA CAACGGCCTG GAAAGCACAG AACCCAGTAC TGAGAGAGGT GGTGGACATA 300
CTTACAGAGC AACTGCGTGA CATTAGCTG GAGAATTACA CACCCAAGGA ACCCCTCACC 360
CTGCAGGCCA GGATGTCTTG TGAGCAGAAA GCTGAAGGAC ACAGCAGTGG ATCTTGGCAG 420
TTCAGTTTCG ATGGGCAGAT CTCCTCCTC TTTGACTCAG AGAAGAGAAT GTGGACAACG 480
GTTTCATCCTG GAGCCAGAAA GATGAAAGAA AAGTGGGAGA ATGACAAGGT TGTGGCCATG 540
TCCTTCCATT ACTTCTCAAT GGGAGACTGT ATAGGATGGC TTGAGGACTT CTTGATGGGC 600
ATGGACAGCA CCCTGGAGCC AAGTGCAGGA GCACCACTCG CCATGTCCTC AGGCACAACC 660

CAACTCAGGG CCACAGCCAC CCCCTCATCC TTGCTGCCT CCTCATCATC CTCCCCTGCT 720
TCATCCTCCC TGGCATCTGA GGAGAGTCCT TTAGAG 756

<210> 3

<211> 40

<212> DNS

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223>

<400> 3

GCGCTCGAAT TCCACCATGG CAGCAGCCGC CGCTACCAAG 40

<210> 4

<211> 76

<212> DNS

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223>

<400> 4

GCGGCCGCTC ACTTGTCATC GTCGTCCTTG TAGTCCTCTA AAGGACTCTC CTCAGATGCC 60
AGGGAGGATG AAGCAG 76

<210> 5

<211> 246

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Met	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Lys	Ile	Leu	Leu	Cys	Leu	Pro	Leu	Leu
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Ser	Gly	Trp	Ser	Arg	Ala	Gly	Arg	Ala	Asp	Pro	His	Ser
				20				25					30		
Leu	Cys	Tyr	Asp	Ile	Thr	Val	Ile	Pro	Lys	Phe	Arg	Pro	Gly	Pro	Arg
			35					40					45		
Trp	Cys	Ala	Val	Gln	Gly	Gln	Val	Asp	Glu	Lys	Thr	Phe	Leu	His	Tyr
			50				55						60		
Asp	Cys	Gly	Asn	Lys	Thr	Val	Thr	Pro	Val	Ser	Pro	Leu	Gly	Lys	Lys
			65			70				75				80	
Leu	Asn	Val	Thr	Thr	Ala	Trp	Lys	Ala	Gln	Asn	Pro	Val	Leu	Arg	Glu
					85					90				95	
Val	Val	Asp	Ile	Leu	Thr	Glu	Gln	Leu	Arg	Asp	Ile	Gln	Leu	Glu	Asn
				100					105				110		
Tyr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Leu	Thr	Leu	Gln	Ala	Arg	Met	Ser	Cys	Glu
			115					120					125		
Gln	Lys	Ala	Glu	Gly	His	Ser	Ser	Gly	Ser	Trp	Gln	Phe	Ser	Phe	Asp
			130				135						140		
Gly	Gln	Ile	Phe	Leu	Leu	Phe	Asp	Ser	Glu	Lys	Arg	Met	Trp	Thr	Thr
			145			150				155				160	
Val	His	Pro	Gly	Ala	Arg	Lys	Met	Lys	Glu	Lys	Trp	Glu	Asn	Asp	Lys
				165					170					175	
Val	Val	Ala	Met	Ser	Phe	His	Tyr	Phe	Ser	Met	Gly	Asp	Cys	Ile	Gly
				180					185					190	
Trp	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu	Met	Gly	Met	Asp	Ser	Thr	Leu	Glu	Pro	Ser
				195					200					205	

Ala Gly Ala Pro Leu Ala Met Ser Ser Gly Thr Thr Gln Leu Arg Ala
 210 215 220
 Thr Ala Thr Thr Leu Ile Leu Cys Cys Leu Leu Ile Ile Leu Pro Cys
 225 230 235 240
 Phe Ile Leu Pro Gly Ile
 245 246

<210> 6

<211> 738

<212> DNS

<213> Human

<400> 6

ATGGCAGCAG CCGCCGCTAC CAAGATCCTT CTGTGCCTCC CGCTTCTGCT CCTGCTGTCC 60
 GGCTGGTCCC GGGCTGGGCG AGCCGACCCT CACTCTCTTT GCTATGACAT CACCGTCATC 120
 CCTAAGTTCA GACCTGGACC ACGGTGGTGT GCGGTTCAAG GCCAGGTGGA TGAAAAGACT 180
 TTTCTTCACT ATGACTGTGG CAACAAGACA GTCACACCTG TCAGTCCCCT GGGGAAGAAA 240
 CTAAATGTCA CAACGGCCTG GAAAGCACAG AACCCAGTAC TGAGAGAGGT GGTGGACATA 300
 CTTACAGAGC AACTGCGTGA CATTCAGCTG GAGAATTACA CACCCAAGGA ACCCCTCACC 360
 CTGCAGGCCA GGATGTCTTG TGAGCAGAAA GCTGAAGGAC ACAGCAGTGG ATCTTGGCAG 420
 TTCAGTTTCG ATGGGCAGAT CTTCTCCTC TTTGACTCAG AGAAGAGAAT GTGGACAACG 480
 GTTCATCCTG GAGCCAGAAA GATGAAAGAA AAGTGGGAGA ATGACAAGGT TGTGGCCATG 540
 TCCTTCCATT ACTTCTCAAT GGGAGACTGT ATAGGATGGC TTGAGGACTT CTTGATGGGC 600
 ATGGACAGCA CCCTGGAGCC AAGTGCAGGA GCACCACTCG CCATGTCCTC AGGCACAACC 660
 CAACTCAGGG CCACAGCCAC CACCCTCATC CTTTGCTGCC TCCTCATCAT CCTCCCCTGC 720
 TTCATCCTCC CTGGCATC 738

<210> 7

<211> 63

<212> DNS

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223>

<400> 7

GCGCTGAATT CCCACCATGG CAGCAGCCGC CGCTACCAAG ATCCTTCTGT GCCTCCCGCT 60

TCT 63

<210> 8

<211> 71

<212> DNS

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223>

<400> 8

TTGCGGCCGC TCACTTGTCA TCGTCGTCCT TGTAGTCGAT GCCAGGGAGG ATGAAGCAGG 60

GGAGGATGAT G 71

<210> 9

<211> 47

<212> DNS

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223>

<400> 9

TTGCGGCCGC TCAGATGCCA GGGAGGATGA AGCAGGGGAG GATGATG 47

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Fehérje, vagy sója, amely az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciával azonos vagy lényegében azonos aminosavszekvenciát tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti fehérje, vagy sója, amelyben az 1. azonosítószámú aminosavszekvenciával lényegében azonos aminosavszekvencia az 5. azonosítószámú aminosavszekvencia.

3. Az 1. igénypont szerinti fehérje, vagy sója, amely rákos sejtekben lett előállítva.

4. Az 1. igénypont szerinti fehérjéből származó részpeptid, vagy sója.

5. A 4. igénypont szerinti részpeptid, vagy sója, amelynek aminosavszekvenciája megegyezik az 1. azonosítószámú aminosavszekvencia 26-34. aminosavaival.

6. A 4. igénypont szerinti részpeptid, vagy sója, amelynek aminosavszekvenciája megegyezik az 5. azonosítószámú aminosavszekvencia 166-190. aminosavaival.

7. Eljárás az 1. igénypont szerinti fehérje vagy a 4. igénypont szerinti részpeptid, vagy sója előállítására, azal jellemezve, hogy az 1. igénypont szerinti fehérjét vagy a 4. igénypont szerinti részpeptidet kódoló DNS-t tartalmazó rekombináns vektort hordozó transzformánst tenyésztünk, és ezáltal előállítjuk a fehérjét vagy a részpeptidet.

8. Antitest az 1. igénypont szerinti fehérje vagy a 4. igénypont szerinti részpeptid, vagy sója ellen.

9. A 8. igénypont szerinti antitest, amely monoklonális antitest.

10. A 8. igénypont szerinti antitest, amely az 1. azonosítószámú aminosavszekvencia 26-34. aminosavaival megegyező aminosavszekvenciájú, 4. igénypont szerinti részpeptid vagy sója elleni antitest.

11. A 8. igénypont szerinti antitest, amely az 5. azonosítószámú aminosavszekvencia 166-190. aminosavaival megegyező aminosavszekvenciájú 4. igénypont szerinti részpeptid vagy sója elleni antitest.

12. Diagnosztikai szer, amely 8. igénypont szerinti antitestet tartalmaz.

13. Gyógyászati készítmény, amely 1. igénypont szerinti fehérjét, 4. igénypont szerinti részpeptidet, vagy sóját, vagy 8. igénypont szerinti antitestet tartalmaz.

14. Eljárás olyan vegyület, vagy sója szűrésére, amely fokozza vagy gátolja az 1. igénypont szerinti fehérje vagy a 4. igénypont szerinti részpeptid, vagy sója aktivitását, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerinti fehérjét vagy a 4. igénypont szerinti részpeptidet, vagy sóját alkalmazzuk.

15. A 14. szerinti eljárás, amelyben az aktivitás sejtproliferációs aktivitás.

16. Reagenskészlet olyan vegyület, vagy sója szűrésére, amely fokozza vagy gátolja az 1. igénypont szerinti fehérje vagy a 4. igénypont szerinti részpeptid, vagy sója aktivitását, és amely 1. igénypont szerinti fehérjét vagy

4. igénypont szerinti részpeptidet tartalmaz, vagy a részpeptid sóját tartalmazza.

17. Vegyület, vagy sója, amely fokozza vagy gátolja az 1. igénypont szerinti fehérje vagy a 4. igénypont szerinti részpeptid, vagy sója aktivitását, és amelyet a 14. igénypont szerinti szűrési eljárással vagy a 16. igénypont szerinti szűrő reagenskészlet segítségével állíthatunk elő.

18. Gyógyászati készítmény, amely olyan vegyületet tartalmaz, vagy sóját tartalmazza, amely fokozza vagy gátolja az 1. igénypont szerinti fehérje vagy a 4. igénypont szerinti részpeptid, vagy sója aktivitását, és amelyet a 14. igénypont szerinti szűrési eljárással vagy a 16. igénypont szerinti szűrő reagenskészlet segítségével állítható elő.

19. A 18. igénypont szerinti gyógyászati készítmény rák megelőzésére vagy kezelésére.

20. Hibridóma, amely 9. igénypont szerinti antitestet tud termelni.

21. A 8. igénypont szerinti antitest, amely neutralizáló antitest.

22. A 8. igénypont szerinti antitest, amely humanizált antitest.

23. Gyógyászati készítmény, amely 22. igénypont szerinti antitestet tartalmaz.

24. A 23. igénypont szerinti gyógyászati készítmény rák kezelésére vagy megelőzésére.

25. Gyógyászati készítmény, amely olyan vegyületet, vagy sóját tartalmazza, amely gátló aktivitást fejt ki az 1. igénypont szerinti fehérje vagy a 4. igénypont szerinti részpeptid, vagy sója természetes killer (ölő) sejtek proliferációját gátló hatására.

26. A 25. igénypont szerinti gyógyászati készítmény rák kezelésére vagy megelőzésére.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivőjelölt

122 oldal leírás
22 oldal rajz

144 oldal

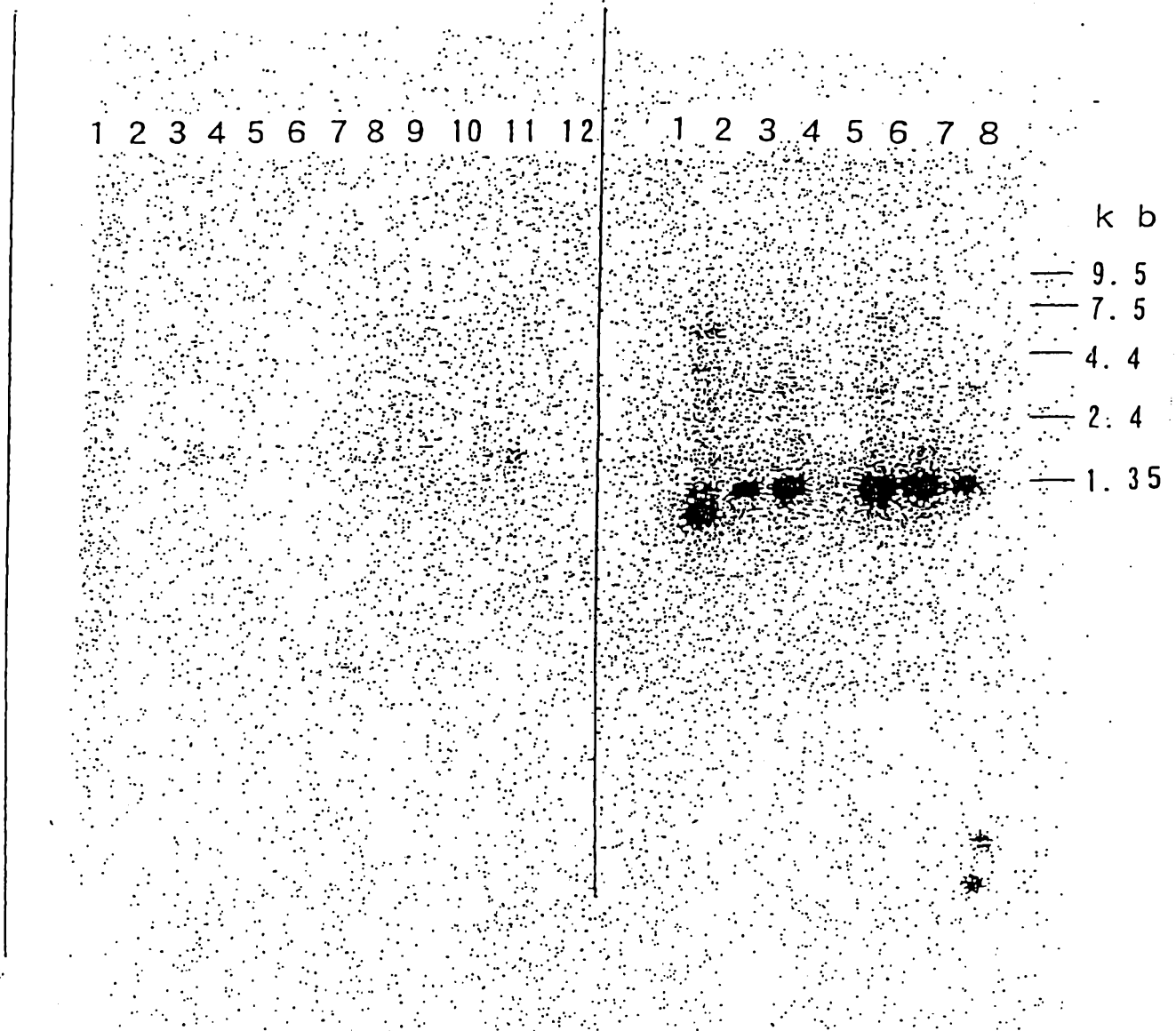


[illegible]

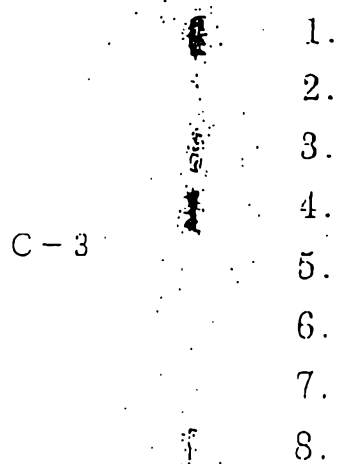
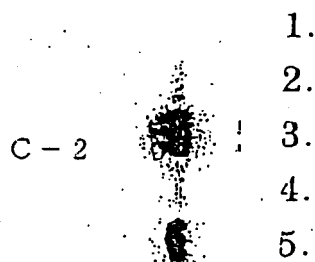
2. ábra

A Normál szövet

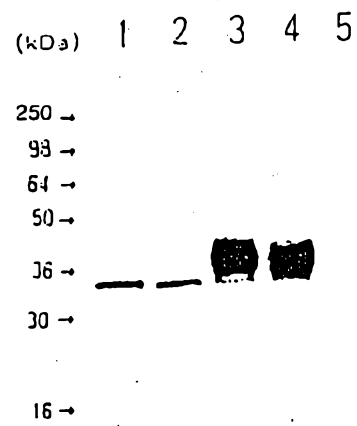
B. Rákos sejt



3. ábra



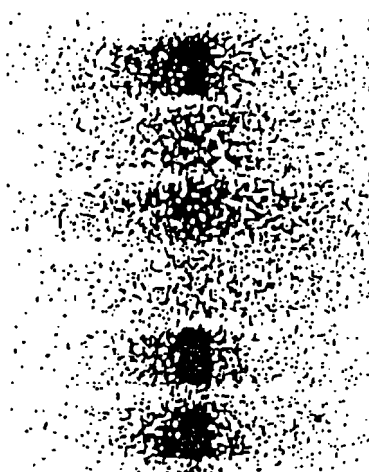
4. ábra



5. ábra

1	AAAACCTTGAGGTGATTCATCTTCCAGGCTCTCCTTCCATCAAGTCTCTCCTCCCTAGCGCTCTGGGTCCTTA	73
74	ATG GCA GCA GCC GCC GCT ACC AAG ATC CTT CTG TGC CTC CCG CTT CTG CTC CTG	127
1	Met Ala Ala Ala Ala Ala Thr Lys Ile Leu Leu Cys Leu Pro Leu Leu Leu Leu	18
128	CTG TCC GGC TGG TCC CGG GCT GGG CGA GCC GAC CCT CAC TCT CTT TGC TAT GAC	181
19	Leu Ser Gly Trp Ser Arg Ala Gly Arg Ala Asp Pro His Ser Leu Cys Tyr Asp	36
182	ATC ACC GTC ATC CCT AAG TTC AGA CCT GGA CCA CGG TGG TGT GCG GTT CAA GGC	235
37	Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro Arg Trp Cys Ala Val Gln Gly	54
236	CAG GTG GAT GAA AAG ACT TTT CTT CAC TAT GAC TGT GGC AAC AAG ACA GTC ACA	289
55	Gln Val Asp Glu Lys Thr Phe Leu His Tyr Asp Cys Gly Asn Lys Thr Val Thr	72
290	CCT GTC AGT CCC CTG GGG AAG AAA CTA AAT GTC ACA ACG GCC TGG AAA GCA CAG	343
73	Pro Val Ser Pro Leu Gly Lys Lys Leu Asn Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln	90
344	AAC CCA GTA CTG AGA GAG GTG GTG GAC ATA CTT ACA GAG CAA CTG CGT GAC ATT	397
91	Asn Pro Val Leu Arg Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Arg Asp Ile	108
398	CAG CTG GAG AAT TAC ACA CCC AAG GAA CCC CTC ACC CTG CAG GCC AGG ATG TCT	451
109	Gln Leu Glu Asn Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser	126
452	TGT GAG CAG AAA GCT GAA GGA CAC AGC AGT GGA TCT TGG CAG TTC AGT TTC GAT	505
127	Cys Glu Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln Phe Ser Phe Asp	144
506	GGG CAG ATC TTC CTC CTC TTT GAC TCA GAG AAG AGA ATG TGG ACA ACG GTT CAT	559
145	Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg Met Trp Thr Thr Val His	162
560	CCT GGA GCC AGA AAG ATG AAA GAA AAG TGG GAG AAT GAC AAG GTT GTG GCC ATG	613
163	Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp Lys Val Val Ala Met	180
614	TCC TTC CAT TAC TTC TCA ATG GGA GAC TGT ATA GGA TGG CTT GAG GAC TTC TTG	667
181	Ser Phe His Tyr Phe Ser Met Gly Asp Cys Ile Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu	198
668	ATG GGC ATG GAC AGC ACC CTG GAG CCA AGT GCA GGA GCA CCA CTC GCC ATG TCC	721
199	Met Gly Met Asp Ser Thr Leu Glu Pro Ser Ala Gly Ala Pro Leu Ala Met Ser	216
722	TCA GGC ACA ACC CAA CTC AGG GCC ACA GCC ACC ACC CTC ATC CTT TGC TGC CTC	775
217	Ser Gly Thr Thr Gln Leu Arg Ala Thr Ala Thr Thr Leu Ile Leu Cys Cys Leu	234
776	CTC ATC ATC CTC CCC TGC TTC ATC CTC CCT GGC ATC TGA GGAGAGTCCTTTAGAGTGA	833
235	Leu Ile Ile Leu Pro Cys Phe Ile Leu Pro Gly Ile ***	246
834	CAGGTTAAAGCTGATACCAAAAGGCTCCTGTGAGCACGGTCTTGATCAAACCTCGCCCTTCTGTCTGGCCAGC	905
906	TGCCCCACGACCTACGGGTGATGTCCAGTGGCCCTCCAGCAGATCATGATGACATCATGGACCCAATAGCTCAT	977
978	TCACTGCCTTGATTCTTTTGGCAACAATTTTACCAGCAGTTATACCTAACATATTATGCAATTTTCTCTTG	1049
1050	GTGCTACCTGATGGAATTCCTGCACCTTAAAGTTCTGGCTGACTAAACAAGATATATCATTCTTCTTCTCTC	1121
1122	TTTTTGTGTTGAAAAATCAAGTACTTCTTTGAATGATGATCTCTTCTTGCAAAATGATATTGTCAGTAAATA	1193
1194	ATCACGTTAGACTTCAGACCTCTGGGGATTCTTTCCGTGCTCCTGAAAGAGAATTTTAAATTATTTAATAAG	1265
1266	AAAAAATTTATATTAAATGATTGTTTCCCTTAGTAATTTATTGTTCTGTACTGATATTTAAATAAGAGTTCT	1337
1338	ATTTCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1362

6. ábra



9.

10.

11.

12.

13.

14.

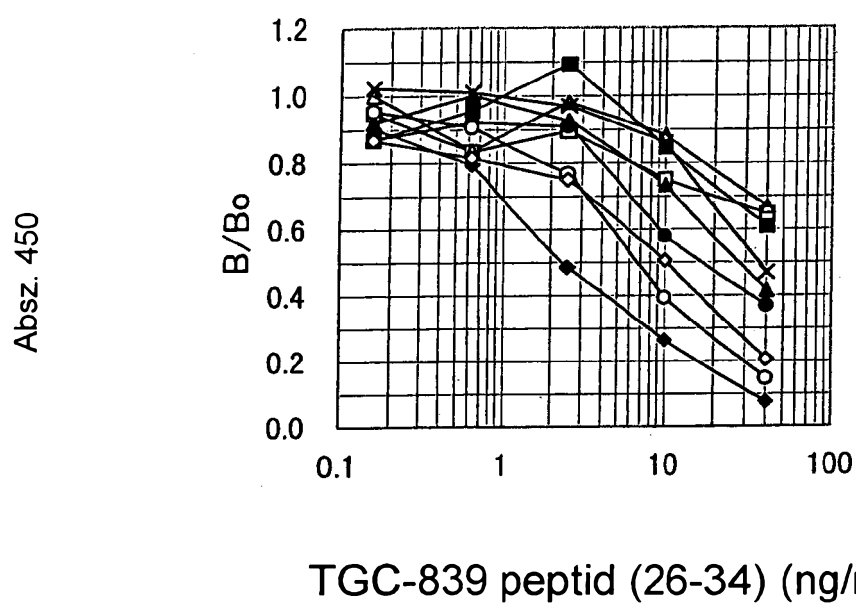


15.

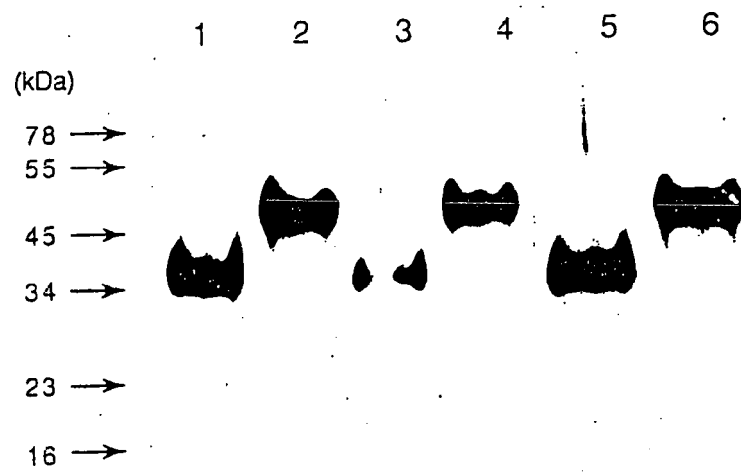
16.

8. ábra

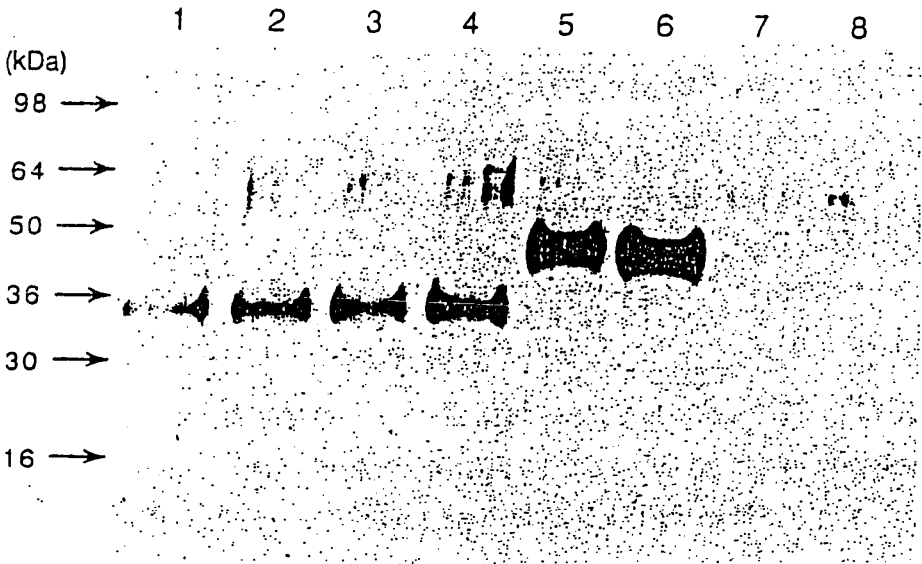
Monoklonális antitestek reaktivitása



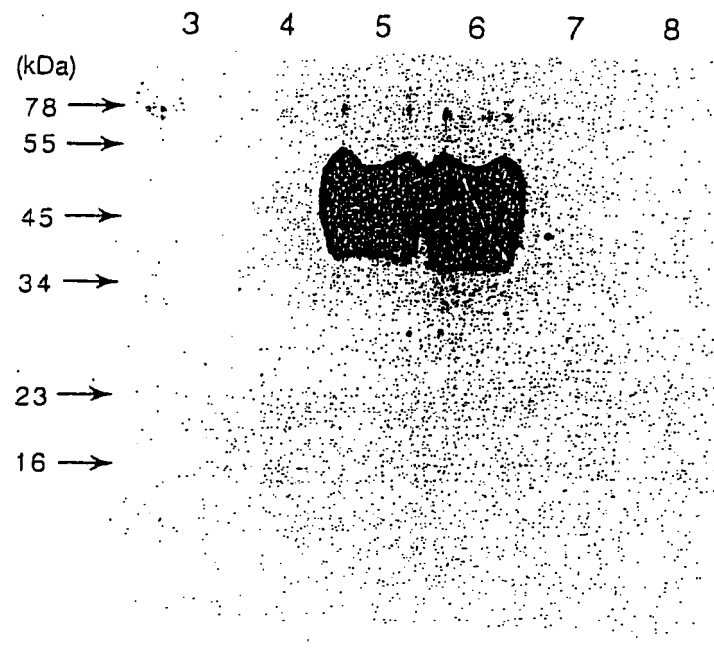
9. ábra



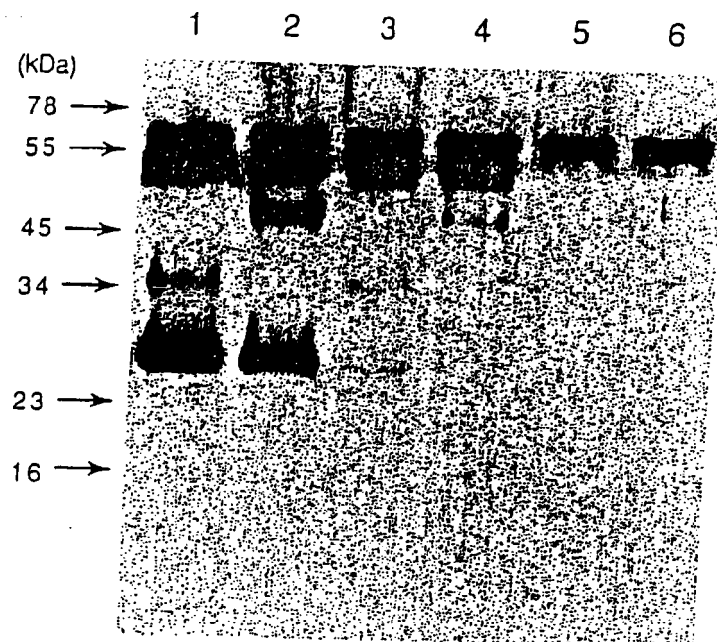
10. ábra



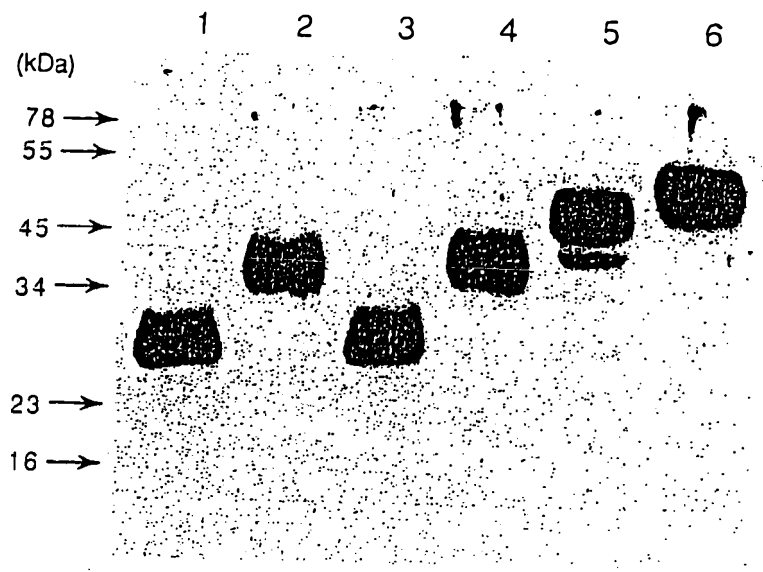
11. ábra



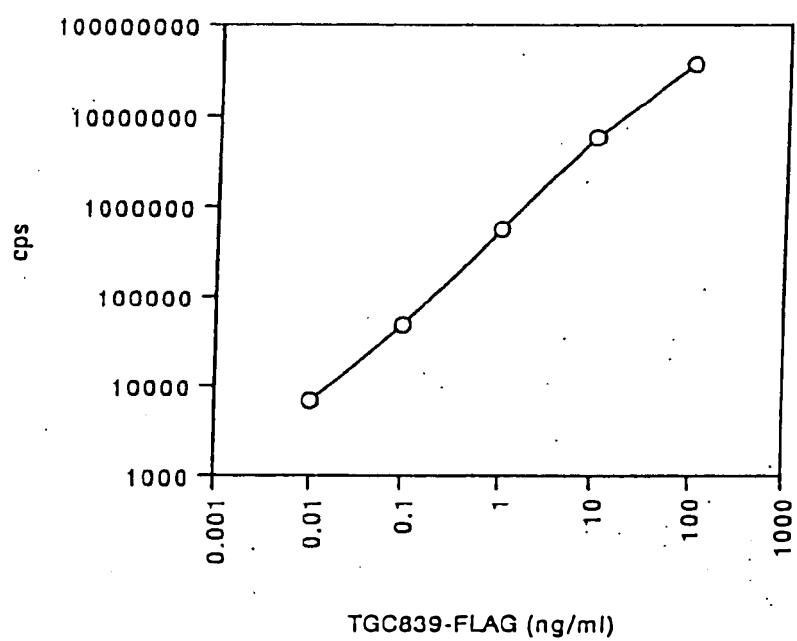
12. ábra



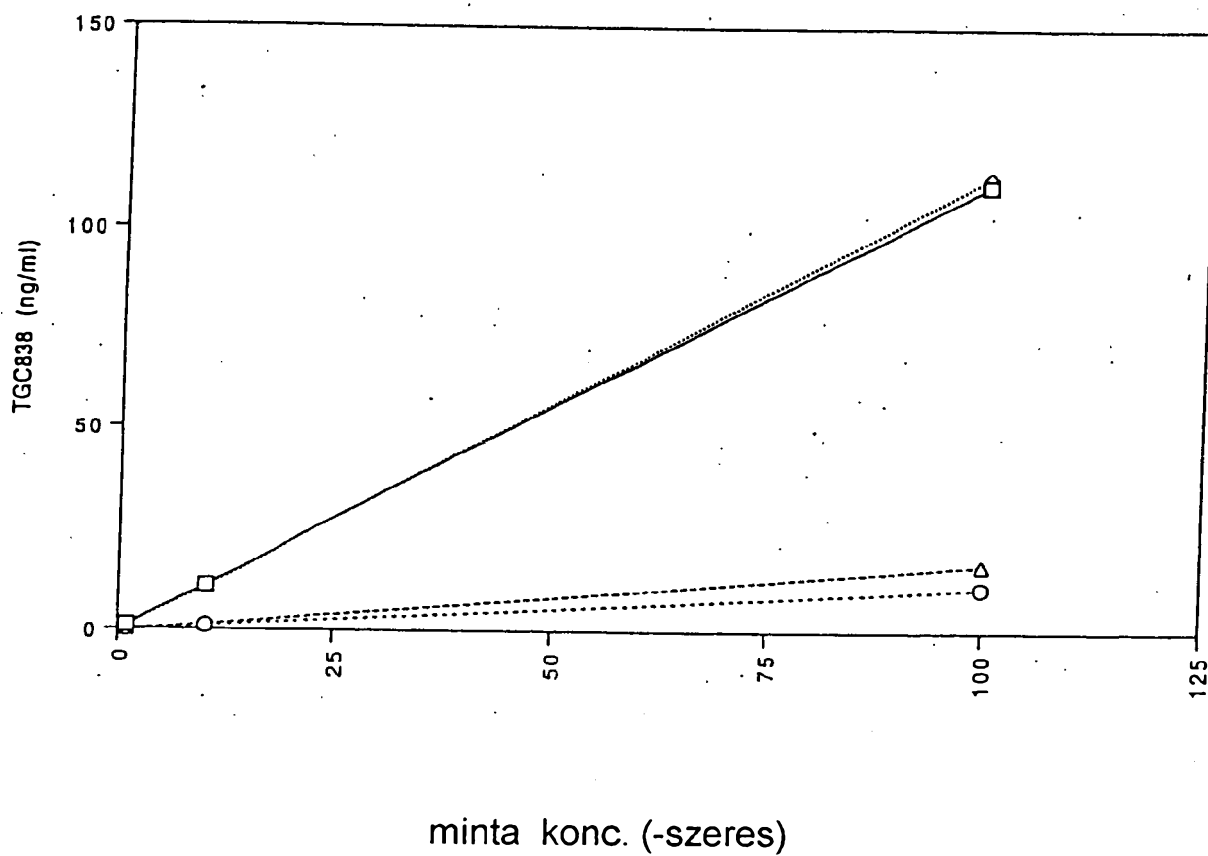
13. ábra



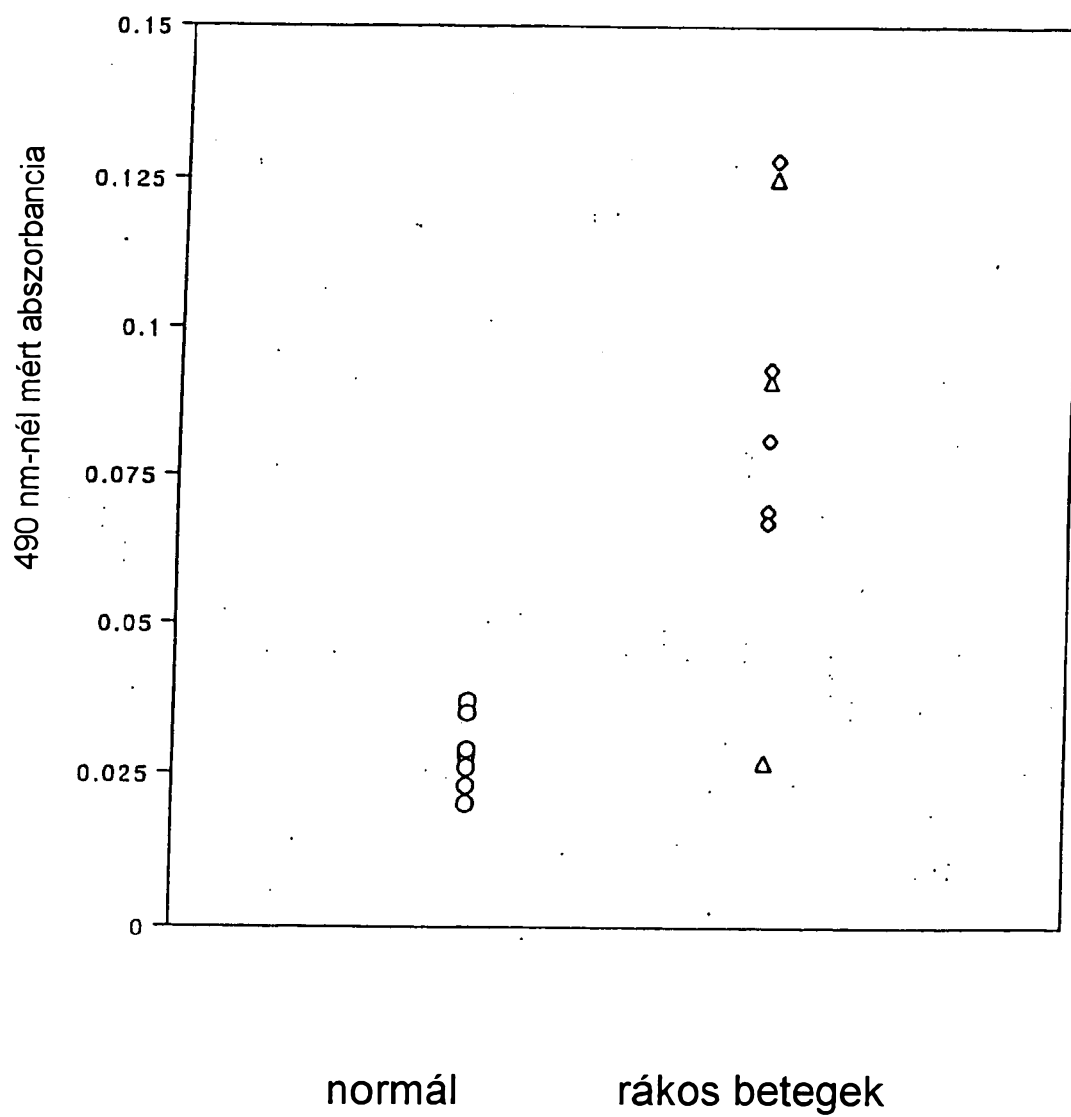
14. ábra



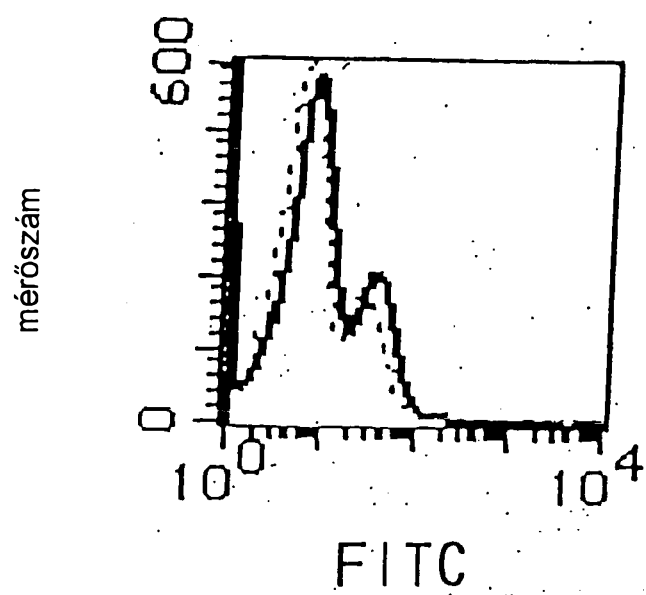
15. ábra



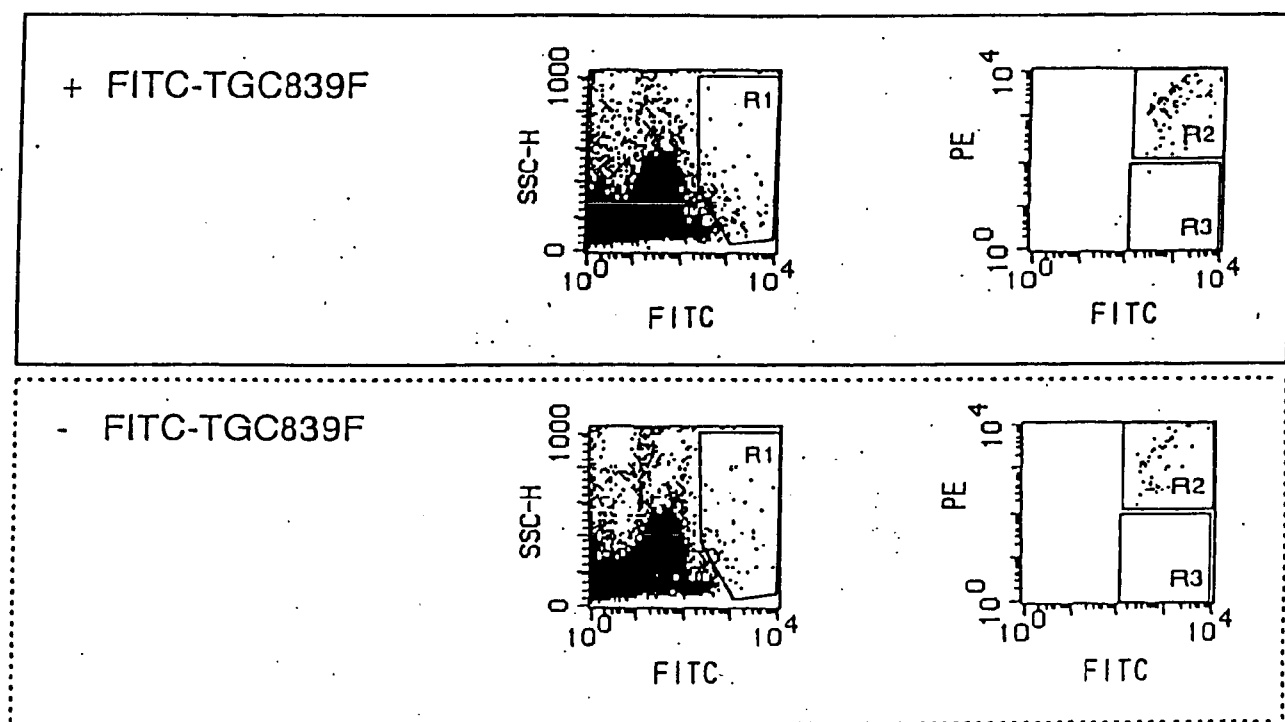
16. ábra



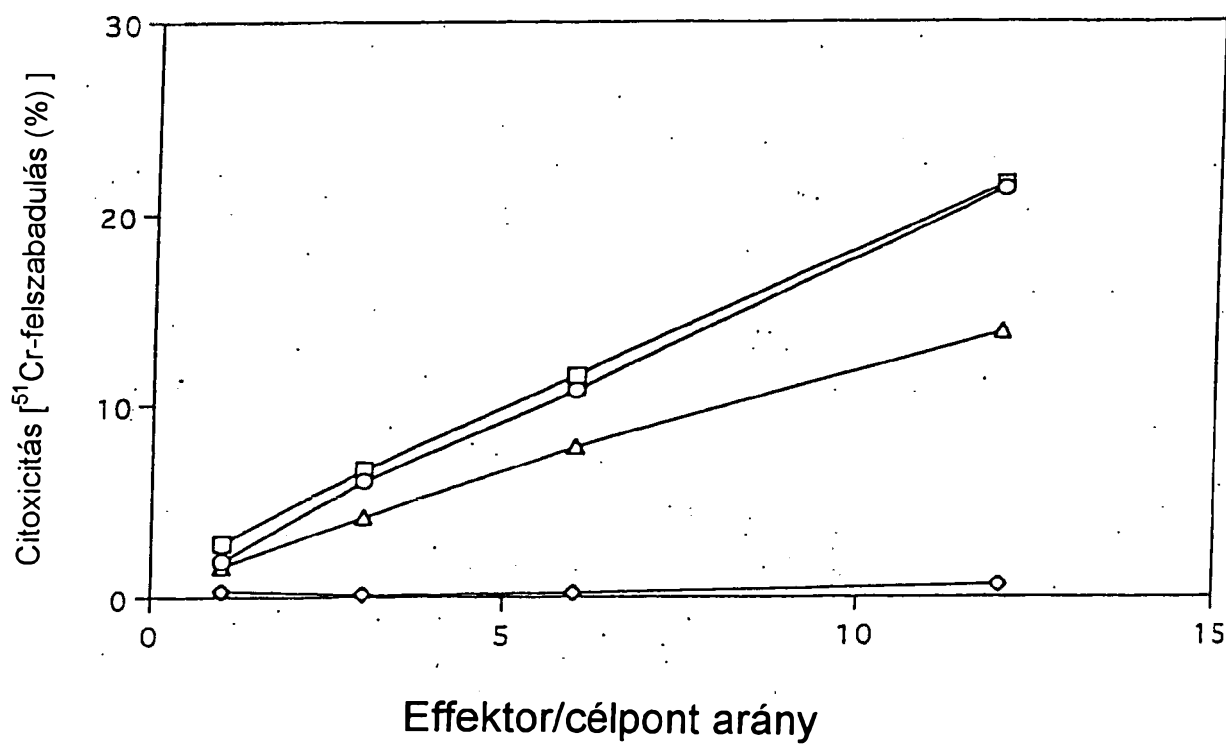
17. ábra



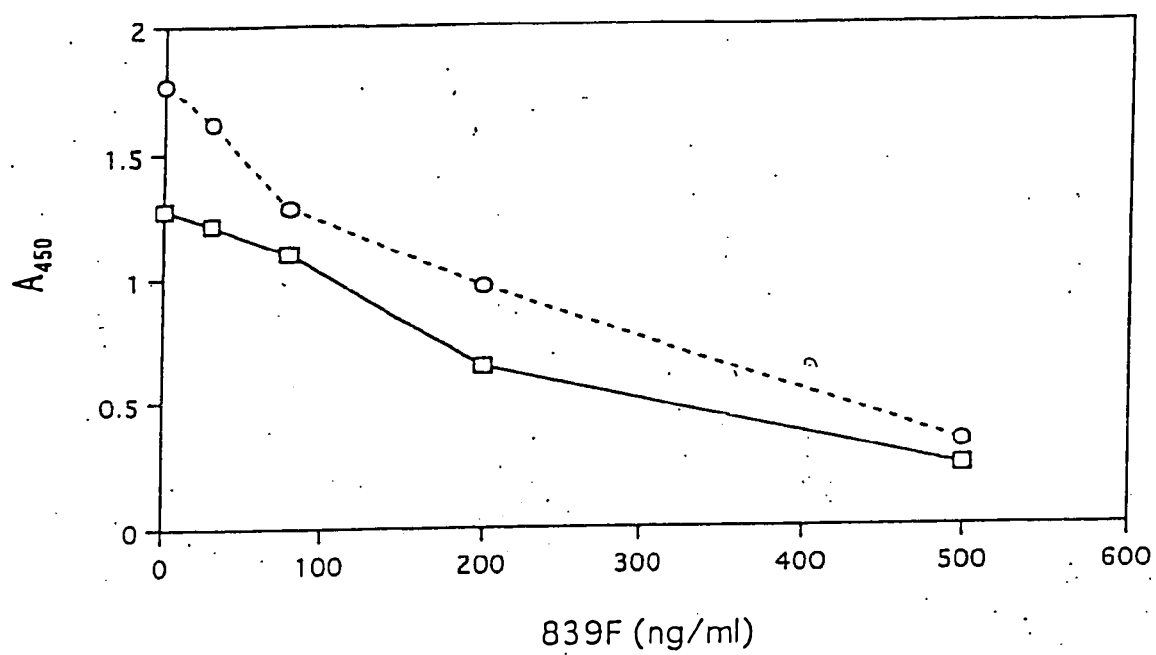
18. ábra



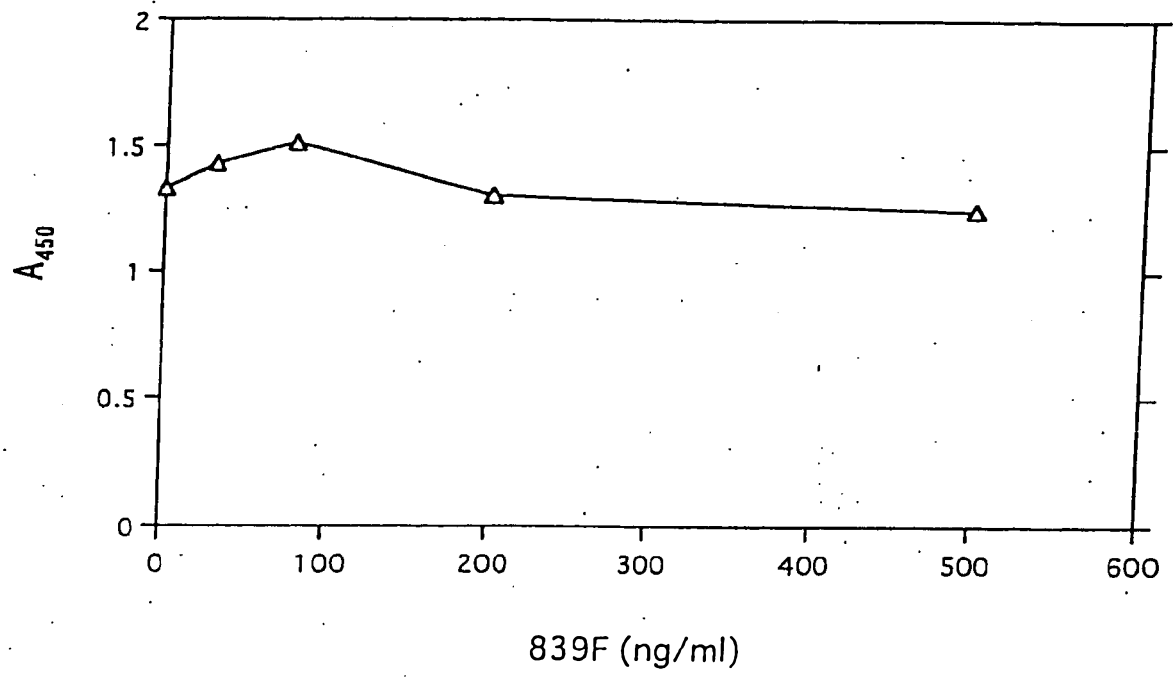
19. ábra



20. ábra



21. ábra



22. ábra

