

Készítmények és eljárások emlőrák gyógykezelésére és diagnosztizálására

Kivonat

5

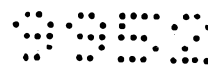
A találmány tárgyát eljárások képezik rák, például emlőrák gyógykezelésére és diagnosztizálására. Közelebbről, a találmány tárgyát olyan polipeptidek képezik, amelyek egy emlőtumor-protein legalább egy részletét tartalmazzák. A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti polipeptideket kódoló polinukleotidok, a találmány szerinti polinukleotidokat tartalmazó expressziós vektorok, valamint a találmány szerinti vektorokkal transzformált gazdasejtek. Szintén a találmány tárgyához tartozik a találmány szerinti polipeptidekhez specifikusan kötődő antitestek és antigénkötő fragmenseik, a találmány szerinti polipeptideket tartalmazó fúziós proteinek, valamint a találmány szerinti polipeptideket, polinukleotidokat, antitesteket, fúziós proteinek vagy T-sejt-populációkat tartalmazó készítmények.

15

A találmány szerinti polipeptidek és polinukleotidok előnyösen alkalmazhatók gyógyászati készítményekben, pl. vakcinákban és egyéb - emlőrák diagnosztizálására és kezelésére alkalmas - készítményekben.

20

Jelentő elbír. Ø
Zolha Andrea

**Készítmények és eljárások emlőrák gyógykezelésére és diagnosztizálására**

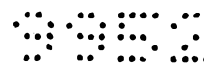
A találmány tárgyát eljárások képezik rák, úgymint emlőrák gyógykezelésére és diagnosztizálására. Közelebbről, a találmány tárgyát olyan polipeptidek képezik, amelyek egy
5 emlőtumor-protein legalább egy részletét tartalmazzák. A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti polipeptideket kódoló polinukleotidok, a találmány szerinti polinukleotidokat tartalmazó expressziós vektorok, valamint a találmány szerinti vektorokkal transzformált gazdasejtek. Szintén a találmány tárgyhöz tartozik a találmány szerinti polipeptidekhez specifikusan kötődő antitestek és antigénkötő fragmenseik, a találmány szerinti polipeptideket tartalmazó fúziós proteinek, valamint a találmány szerinti polipeptideket, polinukleotidokat, antitesteket, fúziós proteineket vagy T-sejt-populációkat tartalmazó készítmények.
10

A találmány szerinti polipeptidek és polinukleotidok előnyösen alkalmazhatók gyógyászati készítményekben, pl. vakcinákban és egyéb - emlőrák diagnosztizálására és kezelésére alkalmas - készítményekben.

15 Az emlőrák a nők jelentős egészségügyi problémáját jelenti az Egyesült Államokban és szerte a világon. Bár e betegség kimutatásában és kezelésében jelentős előrehaladások tapasztalhatók, nőknél az emlőrák továbbra is a rákos eredetű elhalálozások második leggyakoribb okaként tartható számon, ami az Egyesült Államokban évente több, mint 180 000 nőt érint. Észak-Amerikában a nők emlőrákos megbetegedésének kockázata (teljes élettartamot tekintve) egy a nyolchoz.
20

Jelenleg nem áll rendelkezésre emlőrák kezelésére univerzálisan sikeresen alkalmazható eljárás. E betegség kezelése jelenleg a (rutinszerű emlőrákszűrésekkel megvalósított) korai diagnózison és az agresszív kezelésen alapul, mely utóbbi sebészeti beavatkozást, sugárterápiát, kemoterápiát vagy hormonterápiát (vagy ezek kombinációját) foglalhatja magában. Egy
25 adott emlőrák kezelésének mikéntjét gyakran különféle prognosztizáló paraméterek (pl. specifikus tumormarkerek analízise) alapján választják ki [ld. pl. Porter-Jordan és Lippman: Breast Cancer 8, 73 (1994)]. Mindazonáltal, az elfogadott markerek alkalmazása gyakran nehezen értelmezhető eredményhez vezet, és az emlőrákos pácienseknél megfigyelhető nagy mortalitás azt jelzi, hogy nagy szükség van e betegség kezelési, diagnosztizálási és megelőzési módszereinek javítására.
30

Ennek megfelelően, az emlőrák javított gyógykezelési és diagnosztizálási eljárásainak kifejlesztésére van szükség. A találmány megoldást nyújt e szükségletekre, s további előnyöket is biztosít.



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

(a) 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. és 327-330. azonosítószámú szekvencia;

5 (b) az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. és 327-330. azonosítószámú szekvenciák komplementer szekvenciái;

(c) az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. és 327-330. azonosítószámú szekvenciák egyikének legalább 20 szomszédos nukleotidjából álló szekvencia;

10 (d) az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. és 327-330. azonosítószámú szekvenciák egyikével mérsékelten sztringens feltételek mellett hibridizálódó szekvencia;

(e) az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. és 327-330. azonosítószámú szekvenciák egyikével legalább 75 %-ban azonos szekvencia;

15 (f) az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. és 327-330. azonosítószámú szekvenciák egyikével legalább 90 %-ban azonos szekvencia; és

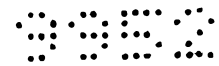
(g) az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. és 327-330. azonosítószámú szekvenciák degenerált változatai.

20 A találmány egyik előnyös megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti polinukleotidok a tesztelt emlőtumorok legalább kb. 20 %-ában, még előnyösebben legalább kb. 30 %-ában, és legelőnyösebben legalább kb. 50 %-ában olyan mértékben expresszálnak, amely a normális szövetekben megfigyelhető expresszió mértékének legalább kb. kétszerese, előnyösen legalább kb. ötszöröse, és legelőnyösebben legalább kb. tízszerese.

25 A találmány egy következő szempontjának megfelelően polipeptideket tárunk fel, amelyek fentebb leírt polinukleotid-szekvencia által kódolt aminosav-szekvenciát tartalmaznak.

Feltárunk továbbá olyan polipeptideket, amelyek a 299., 300., 304-306., 308-312., 314., 326. és 331-334. azonosítószámú aminosav-szekvenciák egyikét tartalmazzák.

30 A találmány bizonyos előnyös megvalósítási módjai értelmében a találmány szerinti polipeptidek és/vagy polinukleotidok immunogén sajátosságúak, azaz - ahogy a későbbiekben részletesen leírjuk - képesek immunreakciót (különösen humorális és/vagy celluláris immunreakciót) kiváltani.



A találmány értelmében feltárjuk a találmány szerinti polipeptid- és/vagy polinukleotid-szekvenciák fragmenseit, változatait és/vagy származékait is, melyek immunogén aktivitása legalább kb. 50 %-a, előnyösen legalább kb. 70 %-a, még előnyösebben legalább kb. 90 %-a 299., 300., 304-306., 308-312., 314., 326. és 331-334. azonosítószámú aminosav-szekvenciák egyikét tartalmazó (vagy az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. és 327-330. azonosítószámú nukleotidszekvenciák egyike által kódolt) polipeptid immunogén aktivitásának.

Feltárjuk továbbá a találmány szerinti polipeptideket kódoló polinukleotidokat; az ilyen polinukleotidokat tartalmazó expressziós vektorokat; valamint az ilyen expressziós vektorokkal transzformált vagy transzfektált gazdasejteket.

A találmány további szempontjainak megfelelően gyógyászati készítményeket tárunk fel, amelyek találmány szerinti polipeptidet vagy polinukleotidot és fiziológiai szempontból elfogadható hordozót tartalmaznak.

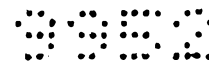
Az egyik megvalósítási mód értelmében a találmány szerinti készítmények, pl. vakcina készítmények, profilaktikus vagy terápiás célra alkalmazhatók. Az ilyen készítmények általában találmány szerinti immunogén polipeptidet vagy polinukleotidot és immunstimulátor anyagot, pl. adjuvánst tartalmaznak.

Ezen túlmenően, a találmány értelmében gyógyászati készítményeket is feltárunk, amelyek a következő komponenseket tartalmazzák: (a) találmány szerinti polipeptidhez specifikusan kötődő antitest vagy annak antigénkötő fragmense; és (b) fiziológiai szempontból elfogadható hordozó.

A találmány további szempontjainak megfelelően, gyógyászati készítményeket tárunk fel, amelyek a következő komponenseket tartalmazzák: (a) találmány szerinti polipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejt; és (b) gyógyászati szempontból elfogadható hordozó vagy segédanyag. Az antigénprezentáló sejtek jellemző példái közé tartoznak, többek között, dendritikus sejtek, makrofágok, monociták, fibroblasztok és B-sejtek.

A találmány előzővel összefüggő szempontjának megfelelően olyan gyógyászati készítményeket is feltárunk, amelyek a következő komponenseket tartalmazzák: (a) találmány szerinti polipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejt; és (b) immunstimuláns.

A találmány további szempontjainak megfelelően fúziós proteineket tárunk fel, amelyek legalább egy fentebb leírt, találmány szerinti polipeptidet tartalmaznak. Feltárjuk továbbá az ilyen fúziós proteineket kódoló polinukleotidokat, jellemzően fiziológiai szempontból elfogadható hordozót és/vagy immunstimulánst tartalmazó gyógyászati készítmények (pl.



vakcinakészítmények) alakjában. A fúziós proteinek több immunogén polipeptidet vagy azok részleteit/változatait tartalmazhatják (ld. később), és egy vagy több olyan polipeptid-szakaszt is tartalmazhatnak, amelyek a polipeptid(ek) termeltetése, tisztítása és/vagy immunogenitása szempontjából előnyösek.

5 A találmány további szempontjainak megfelelően eljárásokat tárunk fel immunreakció stimulálására egy páciensben, előnyösen T-sejtes reakció stimulálására emberben, mely eljárások során a páciensnek találmány szerinti gyógyászati készítményt adagolunk. A találmány szerinti eljárások alkalmazhatók emlőrákos pácienseknél, mely esetben az eljárások a betegség gyógykezelésére szolgálnak, illetve az ilyen betegség kialakulásával veszélyeztetett

10 páciensek esetében megelőzési célból is alkalmazhatók.

A találmány további szempontjainak megfelelően eljárásokat tárunk fel rák kialakulásának gátlására egy páciensben, melyek során a páciensnek találmány szerinti gyógyászati készítményt adagolunk. A szóban forgó eljárások alkalmazhatók emlőráktól szenvedő páciensek kezelésére, mely esetben az eljárások a betegség gyógykezelésére szolgálnak, illetve az

15 ilyen betegség kialakulásával veszélyeztetett páciensek esetében megelőzési célból is alkalmazhatók.

A találmány további szempontjainak megfelelően, eljárásokat tárunk fel tumorsejtek biológiai mintából történő eltávolítására, melyek során egy biológiai mintát olyan T-sejtekkel érintkeztetünk, amelyek specifikusan képesek reagálni egy találmány szerinti polipeptiddel. A

20 szóban forgó eljárásokban az érintkeztetési lépést a proteint expresszáló sejtek eltávolítását elősegítő feltételek mellett és az eltávolításhoz elégséges ideig végezzük.

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

25 A találmány egyéb szempontjainak megfelelően, eljárásokat tárunk fel rák kialakulásának páciensben történő gátlására, melyek a következő lépésekből állnak:

(a) a páciensből izolált, CD4+ és/vagy CD8+ T-sejteket a következők közül egy vagy több vegyülettel, illetve sejttel érintkeztetjük:

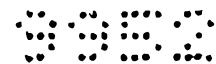
(i) egy találmány szerinti polipeptid legalább egy immunogén részletét tartalmazó

30 polipeptid, és/vagy

(ii) ilyen polipeptidet kódoló polinukleotid, és/vagy

(iii) ilyen polipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejt; és

(b) a páciensnek a proliferálódott T-sejtek hatásos mennyiségét adagoljuk, gátolva



ezáltal a páciensben a rák kialakulását. A proliferálódott sejtek a páciensnek történő beadás előtt, adott esetben, klónozhatók.

A találmány további szempontjainak megfelelően, eljárásokat tárunk fel rák (előnyösen emlőrák) jelenlétének vagy hiányának megállapítására egy páciensben, melyek során:

- 5 (a) a páciensből származó biológiai mintát találmány szerinti polipeptidet megkötő kötőreagenssel érintkeztetjük;
- (b) a mintában kimutatjuk a kötőreagens által megkötött polipeptid mennyiségét; és
- (c) a polipeptid mennyiségét egy előre meghatározott küszöbértékhez viszonyítjuk, és ebből megállapítjuk a rák jelenlétét vagy hiányát. A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint kötőreagensként antitestet, még előnyösebben monoklonális antitestet alkalmazunk.
- 10

A találmány egyéb szempontjainak megfelelően, eljárásokat tárunk fel rák progressziójának páciensben történő ellenőrzésére, mely eljárások a következő lépésekből állnak:

- (a) egy páciensből vett biológiai mintát egy első időpontban találmány szerinti polipeptidet megkötő kötőreagenssel érintkeztetünk;
- 15 (b) a mintában kimutatjuk a kötőreagens által megkötött polipeptid mennyiségét;
- (c) az (a) és (b) lépést a páciensből egy későbbi időpontban vett biológiai minta alkalmazásával megismételjük; és
- (d) a polipeptid (c) lépésben kimutatott mennyiségét a (b) lépésben meghatározott mennyiséghez viszonyítjuk, és ennek alapján nyomon követjük a rák progresszióját.
- 20

A találmány további szempontjainak megfelelően, eljárásokat tárunk fel rák jelenlétének vagy hiányának megállapítására egy páciensben, melyek során

- (a) a páciensből származó biológiai mintát találmány szerinti polipeptidet kódoló polinukleotidhoz hibridizáló oligonukleotiddal érintkeztetjük;
- (b) a mintában kimutatjuk az oligonukleotidhoz hibridizálódott polinukleotid (előnyösen mRNS) mennyiségét; és
- 25

- (c) az oligonukleotidhoz hibridizálódott polinukleotid mennyiségét egy előre meghatározott küszöbértékkel hasonlítjuk össze, és ebből megállapítjuk a rák jelenlétét vagy hiányát. Bizonyos megvalósítási módokban az mRNS mennyiségét polimeráz-láncreakcióval határozzuk meg, melynek során, például, legalább egy olyan láncindító oligonukleotidot alkalmazunk, amely találmány szerinti polipeptidet kódoló polinukleotidhoz vagy annak komplementeréhez hibridizál. Más megvalósítási módok szerint az mRNS mennyiségét - találmány szerinti polipeptidet kódoló polinukleotidhoz vagy annak komplementeréhez hibridizálódó oligonukleotid-próba alkalmazásával - hibridizációs technikával határozzuk meg.
- 30

A találmány előzőkkel összefüggő szempontjainak megfelelően, eljárásokat tárunk fel rák progressziójának páciensben történő ellenőrzésére, melyek során

(a) egy páciensből vett biológiai mintát találmány szerinti polipeptidet kódoló polinukleotidhoz hibridizáló oligonukleotiddal érintkeztetünk;

5 (b) a mintában kimutatjuk az oligonukleotidhoz hibridizálódott polinukleotid mennyiségét; (c) az (a) és (b) lépést a páciensből egy későbbi időpontban vett biológiai minta alkalmazásával megismételjük; és

10 (d) a polinukleotid (c) lépésben kimutatott mennyiségét a (b) lépésben meghatározott polinukleotid-mennyiséghez viszonyítjuk, és ennek alapján nyomon követjük a rák progresszióját.

15 A találmány további megvalósítási módjai értelmében antitesteket (pl. monoklonális antitesteket) tárunk fel, amelyek találmány szerinti polipeptidhez kötődnek. Szintén a találmány tárgyához tartoznak az ilyen antitesteket tartalmazó diagnosztikai készletek, valamint az egy vagy több láncindító oligonukleotidot vagy oligonukleotid-próbát tartalmazó diagnosztikai készletek.

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

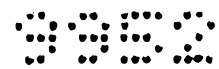
A következőkben az ábrák rövid leírását ismertetjük.

20 Az 1. ábrán differenciális "display" polimeráz-láncreakció - gélelektroforézissel elválasztott - termékeit mutatjuk be, melyeket normál emlőszövetből készített cDNS-ből (1. és 2. sáv), illetve ugyanazon páciens emlőtumor-szövetéből készített cDNS-ből (3. és 4. sáv) kaptunk. A nyíl a B18Ag1-nek megfelelő csíkot jelzi.

25 A 2. ábrán a B18Ag1-mRNS emlőtumor-szövetben kimutatható mennyiségét (1. sáv) normál emlőszövetben kimutatható mennyiségével (2. sáv) összehasonlító "northern-blot" analízis eredménye látható.

A 3. ábrán B18Ag1-mRNS emlőtumor-szövetben - RNáz-védettség tesztel meghatározott - mennyiségét különböző normál és nem emlőtumoros szövetekben mért mennyiségével hasonlítjuk össze.

30 A 4. ábrán genetikai klóntérkép látható, amelyen feltüntettük a XbaI-endonukleázal végzett emésztésekkel kapott szubklónok végeiről származó, további retrovirális szekvenciák (3-10. azonosítószámú szekvenciák) B18Ag1-hez viszonyított elhelyezkedését.



Az 5/A és 5/B ábrán a B18Ag1-et tartalmazó retrovirális elem szekvenálási stratégiáját, genomi szerveződését és megjósolt nyitott leolvasási fázisát mutatjuk be.

A 6. ábrán a reprezentatív, emlőtumor-specifikus B18Ag1-cDNS nukleotidszekvenciáját mutatjuk be.

5 A 7. ábrán a reprezentatív, emlőtumor-specifikus B17Ag1-cDNS nukleotidszekvenciáját mutatjuk be.

A 8. ábrán a reprezentatív, emlőtumor-specifikus B17Ag2-cDNS nukleotidszekvenciáját mutatjuk be.

10 A 9. ábrán a reprezentatív, emlőtumor-specifikus B13Ag2-cDNS nukleotidszekvenciáját mutatjuk be.

A 10. ábrán a reprezentatív, emlőtumor-specifikus B13Ag1b-cDNS nukleotidszekvenciáját mutatjuk be.

A 11. ábrán a reprezentatív, emlőtumor-specifikus B11Ag1-cDNS nukleotidszekvenciáját mutatjuk be.

15 A 12. ábrán a reprezentatív, emlőtumor-specifikus B11Ag1-cDNS nukleotidszekvenciáját mutatjuk be.

A 13. ábrán a reprezentatív, emlőtumor-specifikus B3CA3c-cDNS nukleotidszekvenciáját mutatjuk be.

20 A 14. ábrán a reprezentatív, emlőtumor-specifikus B9CG1-cDNS nukleotidszekvenciáját mutatjuk be.

A 15. ábrán a reprezentatív, emlőtumor-specifikus B9CG3-cDNS nukleotidszekvenciáját mutatjuk be.

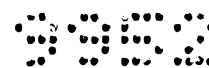
A 16. ábrán a reprezentatív, emlőtumor-specifikus B2CA2-cDNS nukleotidszekvenciáját mutatjuk be.

25 A 17. ábrán a reprezentatív, emlőtumor-specifikus B3CA1-cDNS nukleotidszekvenciáját mutatjuk be.

A 18. ábrán a reprezentatív, emlőtumor-specifikus B3CA2-cDNS nukleotidszekvenciáját mutatjuk be.

30 A 19. ábrán a reprezentatív, emlőtumor-specifikus B3CA3-cDNS nukleotidszekvenciáját mutatjuk be.

A 20. ábrán a reprezentatív, emlőtumor-specifikus B3CA1-cDNS nukleotidszekvenciáját mutatjuk be.



A 21/A ábrán emlőtumor-gének emlőtumorszövetben (1-8. sáv), normál emlőszövetben (9-13. sáv) és vízben (14. sáv) végzett RT-PCR-analízisének eredményeit mutatjuk be.

A 21/B ábrán emlőtumor-gének következő forrásokban végzett RT-PCR-analízisének eredményeit mutatjuk be prosztatatumorok (1. és 2. sáv), vastagbél tumorok (3. sáv),
5 tüdő tumor (4. sáv), normál prosztata (5. sáv), normál vastagbél (6. sáv), normál vese (7. sáv),
normál máj (8. sáv), normál tüdő (9. sáv), normál petefészek (10. és 18. sáv), normál hasnyálmirigy (11. és 12. sáv), normál vázizomszövet (13. sáv), normál bőr (14. sáv), normál gyomor (15. sáv), normál here (16. sáv), normál vékonybél (17. sáv), HBL-100 (19. sáv), MCF-12A (20. sáv), emlőtumorok (21-23. sáv), víz (24. sáv) és vastagbél tumor (25. sáv).

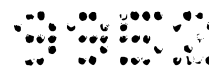
10 A 22. ábrán az anti-B11-8 citotoxikus T-limfocita vonal B11Ag1-peptidet felismerő aktivitását szemléltetjük.

A 23. ábrán a B11-8-specifikus A1-klón B11Ag1-antigénnel transzdukált sejt vonalat felismerő aktivitását szemléltetjük.

15 A 24. ábrán a B11-8-specifikus A1-klón tüdőadenocarcinoma-sejt vonalat (LT-140-22) és emlőadenocarcinoma-sejt vonalat (CAMA-1) felismerő aktivitását szemléltetjük.

A találmány tárgyát készítmények és azok alkalmazása képezi rák - elsősorban emlőrák - kezelésére és diagnosztizálására. Ahogy azt később részletesen leírjuk, a találmány szerinti, jellemző készítmények, többek között, polipeptideket (elsősorban immunogén sajátosságú polipeptideket), ilyen polipeptideket kódoló polinukleotidokat, antitesteket és egyéb
20 kötőreagenseket, antigénprezentáló sejteket és immunrendszeri sejteket (pl. T-sejteket) tartalmaznak.

A találmány gyakorlati kivitelezése során - hacsak másképpen nem jelezzük - szakember számára jól ismert virológiai, immunológiai, mikrobiológiai, molekuláris biológiai és rekombináns DNS-technikákat alkalmazunk (melyek közül a leírásban szemléltetés céljából
25 többet is ismertetünk). E technikák részletes leírása az idevonatkozó szakirodalomban megtalálható [ld. pl. Sambrook és mtsai.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. kiadás (1989); Maniatis és mtsai.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1982); "DNA Cloning: A Practical Approach", I. és II. kötet (szerk.: D. Glover); "Oligonucleotide Synthesis", szerk.: N. Gait (1984); "Nucleic Acid Hybridization", szerk.: Hames és Higgins
30 (1985); "Transcription and Translation", szerk.: Hames és Higgins (1984); "Animal Cell Culture", szerk.: R. Freshney (1986); Perbal: "A Practical Guide to Molecular Cloning" (1984)].



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

Ahogy a leírásban és az igénypontokban használjuk, az egyes számban alkalmazott "egy", "a" és "az" névelők többes számú jelentést is magukban hordoznak, hacsak a szöveg-
5 összefüggés nem utal egyértelműen az ellenkezőjére.

Poliipeptidek

A találmány leírásában a "poliipeptid" kifejezést szokványos értelmében használjuk, vagyis aminosav-szekvenciát értünk rajta, melynek hosszúsága nincs definiálva, így a poliipeptid kifejezés jelentése a peptidekre, oligopeptidekre és proteinekre egyaránt kiterjed,
10 ugyanakkor, jelentésébe nem tartoznak bele a poliipeptid expresszió utáni módosításai (pl. glikoziláltság, acetiláltság, foszforiláltság), valamint az egyéb, természetes vagy mesterséges módosítások. A poliipeptid lehet teljes protein vagy annak szekvencia-részlete. A találmány szerinti poliipeptidek olyan aminosav-szekvenciák, amelyek epitópokat, vagyis olyan antigénhatású determinánsokat tartalmaznak, amelyek a poliipeptid immunogén sajátosságaiért
15 felelősek és immunreakció kiváltására alkalmasak.

A találmány szerinti jellemző poliipeptidek az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. és 327-330. azonosítószámú szekvenciaként megadott polinukleotid-szekvenciák - vagy az ezekkel mérsékelten sztringens (vagy más módon, nagy-
20 mértékben sztringens) feltételek mellett hibridizálódni képes - szekvenciák bármelyike által kódolt poliipeptidek. A találmány szerinti poliipeptidek további jellemző képviselői a 299., 300., 304-306., 308-312., 314., 326. és 331-334. azonosítószámú aminosav-szekvenciákat tartalmazó poliipeptidek.

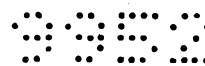
A találmány szerinti poliipeptideket emlőtumor-proteineknek vagy emlőtumor-poliipeptideknek is nevezzük, ami arra utal, hogy azonosításuk - legalább részben - a
25 emlőtumor-mintákban megfigyelhető fokozott mértékű termelődésükön alapul. Ilyenformán, általános értelemben, a "emlőtumor-poliipeptid" vagy "emlőtumor-protein" kifejezés találmány szerinti poliipeptid-szekvenciára vagy az azt kódoló polinukleotid-szekvenciára vonatkozik, amely a emlőtumor-mintákban jelentős hányadában (például, kb. 20 %-nál nagyobb, előnyö-
sebben kb. 30 %-nál nagyobb, legelőnyösebben kb. 50 %-nál nagyobb hányadában) a normális
30 szövetekben megfigyelhető expresszióhoz képest legalább kétszer, előnyösen legalább ötször nagyobb mértékben expresszálódik (a későbbiekben leírt reprezentatív analízissel végzett meghatározás szerint). Ahogy azt a későbbiekben részletesen leírjuk, a találmány szerinti emlőtumorpoliipeptid-szekvencia - tumorsejtekben megfigyelhető fokozott mértékű termelő-

désének köszönhetően - különösen előnyösen alkalmazható diagnosztikai markerként és terápiás célpontként egyaránt.

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

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

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



polipeptid immunogén aktivitásának több, mint 100 %-a vagy több, mint 150 %-a).

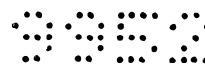
Bizonyos megvalósítási módokban az immunogén polipeptid-részletek közé tartoznak az olyan peptidek, amelyek N-terminális vezetőszekvenciája és/vagy transzmembrán-doménje deletálva van. Más jellemző immunogén polipeptid-részletek - az érett proteinhez viszonyítva - rövid (pl. 1-30 aminosavas, előnyösen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

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

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

A találmány egy következő szempontjának megfelelően, polipeptid-fragmenseket tárunk fel, amelyek a találmány szerinti polipeptidek (pl. a 299., 300., 304-306., 308-312., 314., 326. és 331-334. azonosítószámú aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptidek vagy az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. és 327-330. azonosítószámú polinukleotid-szekvenciák által kódolt polipeptidek) legalább kb. 5, 10, 15, 20, 25, 50 vagy 100 vagy még több, egymással szomszédos aminosavából állnak (ideértve valamennyi köztes hosszúságú fragmenst).

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



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

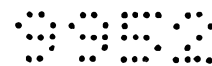
5 A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti polipeptid-fragmensek és -változatok egy találmány szerinti polipeptid-változat immunogén aktivitásának legalább kb. 50 %-ával, előnyösen legalább kb. 70 %-ával, legelőnyösebben legalább kb. 90 %-ával bírnak.

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

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

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

30 Például, bizonyos aminosavak más aminosavakkal helyettesíthetők, anélkül, hogy a protein - például, antitestek antigénkötő régióival vagy szubsztrátmolekulák kötőhelyeivel - interaktív kötési képessége jelentős mértékben csökkenne. Mivel a protein interaktív képessége és természete határozza meg a protein biológiai aktivitását, a protein aminosav-

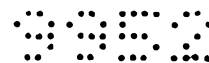


- szekvenciájában - és természetesen az azt kódoló DNS nukleotidszekvenciájában is - végrehajthatók bizonyos szubsztitúciók, melyekkel, hasonló tulajdonságú proteinek nyerhetők. Ennek megfelelően, a találmány szerinti polipeptidek aminosav-szekvenciájában - vagy az azokat kódoló DNS-szekvenciákban - különböző változtatások hajthatók végre, anélkül, hogy biológiai alkalmazhatóságuk vagy aktivitásuk jelentős mértékben csökkenne.
- 5

1. táblázat

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

- A szóban forgó módosítások végrehajtásakor az aminosavak hidropátias indexét kell figyelembe venni. A proteinek interaktív biológiai funkcióját illetően a hidropátias index jelentősége jól ismert [ld. Kyte és Doolittle (1982), melyet teljes terjedelmében a kitanítás ré-
- 10



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

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

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

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

min és aszparagin; és valin, leucin és izoleucin.

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

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

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

Két polipeptid-szekvencia összehasonlítását illetően, két szekvencia akkor "azonos",
30 ha aminosavaik sorrendje - maximális megfeleltetéssel végzett összehasonlítással - megegyezik. Két szekvencia összehasonlítását rendszerint úgy hajtjuk végre, hogy a szekvenciákat - a szekvencia-hasonlóság lokális régióinak azonosítása és összehasonlítása céljából - egy összehasonlítási ablakon belül hasonlítjuk egymáshoz. Ahogy itt használjuk, az "összehasonlítási

ablak" kifejezésen legalább 20, rendszerint kb. 30-75, kb. 40-50 szomszédos pozícióból álló szakaszt értünk, amelyen belül egy szekvencia azonos számú szomszédos pozícióból álló vonatkoztatási szekvenciával hasonlítható össze (miután a két szekvenciát optimális megfeleltetéssel egymás alá rendeztük).

5 A szekvenciák optimális egymás alá rendezését ("alignment") - alapértelmezett paraméterek alkalmazásával - a Lasergene bioinformatikai szoftvercsomag Megalign-programjával (DNASTAR, Inc., Madison, WI) végezhetjük. Ez a program több egymás alá rendezési sémát foglal magában, melyek leírása a következő forrásokban található: "Atlas of Protein Sequences and Structure", National Biomedical Research Foundation", Washington DC, 10 szerk.: Dayhoff, 5. kötet (3. melléklet) 345-358. old. (1978); Hein: Methods in Enzymology 183, 626 (1990); Higgins és Sharp: CABIOS 5, 151 (1989); Myers és Muller: CABIOS 4, 11 (1988); Robinson: Comb. Theor. 11, 105 (1971); Santou és Nes: Mol. Biol. Evol. 4, 406 (1987); Sneath és Sokal: "Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy", Freeman Press, San Francisco, CA (1973); Wilbur és Lipman: Proc. Natl. Acad. 15 Sci. USA 80, 726 (1983).

Más módon, az összehasonlításhoz a szekvenciák optimális egymás alá rendezése végrehajtható a Smith és Waterman [Add. Apl. Math. 2, 482 (1981)] által leírt lokális azonossági algoritmussal; a Needleman és Wunsch [J. Mol. Biol. 48, 443 (1970)] által leírt azonossági "alignment" algoritmussal; Pearson és Lipman [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444 20 (1988)] hasonlóságkeresési eljárásaival; ezen algoritmusok számítógépes változataival (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA és TFASTA, melyek a Wisconsin Genetics szoftvercsomag részei (Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) vagy szemrevételezéssel.

A százalékos szekvencia-azonosság és -hasonlóság meghatározására alkalmas algoritmusok előnyös példaként említhető a BLAST és a BLAST 2.0 algoritmus [leírásukat illetően ld. Altschul és mtsai.: Nucleic Acids Res. 25, 3389 (1977); illetve Altschul és mtsai.: J. 25 Mol. Biol. 215, 403 (1990)]. A BLAST és BLAST 2.0 algoritmus - például, az általunk leírt paraméterekkel - alkalmas a találmány szerinti polinukleotidok és polipeptidek százalékos szekvencia-azonosságának meghatározására. A BLAST-analízisek végrehajtására alkalmazható szoftver a National Center for Biotechnology Information intézeten keresztül mindenki 30 számára hozzáférhető. Az aminosav-szekvenciák esetében az összesített pontszám kiszámítására pontozási mátrix alkalmazható. A szótalálatok kiterjedése - bármely irányban - akkor áll meg, ha a összesített pontszám a maximális elért értékéről "X" mennyiséggel csökken; ha az összesített pontszám nullára vagy az alá csökken (egy vagy több negatív pontszámú aminosav-

megfeleltetés felhalmozódása miatt); vagy ha a szekvencia bármely végét elérjük. A BLAST-algoritmus paraméterei (W, T és X) határozzák meg az egymás alá rendezés érzékenységet és sebességét.

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

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

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

sási fázisba kerüljenek. Ez lehetővé teszi a két szekvencia egyetlen fúziós polipeptiddé történő translációját. Az így kapott fúziós polipeptid mindkét polipeptid-komponens biológiai aktivitását megtartja.

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

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

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

A találmány egyik előnyös megvalósítási módja értelmében az immunológiai fúziós partner Mycobacterium fajból származik (pl. Mycobacterium tuberculosis-eredetű Ra12-fragmens). Az Ra12-készítményeket és heterológ polinukleotid/polipeptid-szekvenciák

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

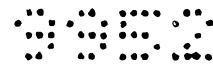
A találmány további megvalósítási módjai szerint az immunológiai fúziós partner a Gram-negatív Haemophilus influenzae-B baktérium D-proteinjéből származik (ld. WO 91/18926 számú nemzetközi közzétételi irat). A D-protein származéka előnyösen a protein kb. első harmadát tartalmazza (pl. az N-terminális végről 100-110 aminosavat), és a D-protein-származék lipidált lehet. A találmány bizonyos előnyös megvalósítási módjai szerint az N-terminálishoz egy lipoprotein-D fúziós partner első 109 aminosavát kapcsoljuk, miáltal a polipeptidet további exogén T-sejt-epitópokkal látjuk el, és fokozzuk E. coli sejtekben történő termelődését (ezáltal termelődésfokozó partnerként funkcionál). A lipidfarak biztosítja az antigén antigénprezentáló sejtek számára történő optimális prezentálását. Egy további fúziós

partner az influenzavírus nem strukturális NS1-proteinje (hemagglutinin). Rendszerint 81 aminosavból álló N-terminális fragmensét alkalmazzuk, bár a T-helper epitópokat magukban foglaló egyéb fragmensek is megfelelőek.

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

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

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



szerint működtethetők.

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

Polinukleotidok

A találmány további szempontjainak megfelelően, polinukleotidokat tárunk fel. A "DNS" és "polinukleotid" kifejezéseket lényegében egymással felcserélhető módon használjuk, és olyan DNS-molekulára vonatkoznak, amely egy adott faj össz genomi DNS-étől izolálva van. Ahogy itt használjuk, az "izolált" kifejezés azt jelenti, hogy a polinukleotid lényegében mentes egyéb kódolószekvenciáktól,

és nem tartalmaz más kódoló-DNS-ekből származó nagyobb részleteket (pl. nagy kromoszomális fragmenseket, egyéb funkcionális géneket vagy polipeptidet kódoló régiókat). Természetesen ez az eredetileg izolált DNS-molekulára vonatkozik, és nem zárja ki a gének vagy kódolórégiók későbbi mesterséges hozzáadásának lehetőségét.

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

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

A polinukleotidok natív szekvenciát (vagyis találmány szerinti polipeptidet/proteint kódoló endogén szekvenciát vagy annak részletét) vagy polipeptid-változatot vagy -származé-

kot (előnyösen immunogén változatot vagy származékot) kódoló szekvenciát tartalmazhatnak.

Ennek megfelelően, a találmány egy következő szempontja szerint olyan polinukleotidokat tárunk fel, amelyek a következő szekvenciák egyikének egészét vagy részét tartalmazzák: 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. és 327-330. azonosítószámú szekvenciák; az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. és 327-330. azonosítószámú szekvenciák komplementer szekvenciái; és az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. és 327-330. azonosítószámú szekvenciák degenerált változatai. A találmány bizonyos előnyös megvalósítási módjai értelmében az itt felsorolt polinukleotid-szekvenciák találmány szerinti immunogén polipeptideket kódolnak.

A találmány további megvalósítási módjai szerint polinukleotid-változatokat tárunk fel, amelyek az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. és 327-330. azonosítószámú szekvenciák bármelyikével lényegében azonosak, például, amelyek (a leírásban ismertetett eljárásokkal, pl. standard paraméterekkel végzett BLAST-analízissel végzett meghatározás szerint) legalább 75 %-ban, előnyösen legalább 75 %-ban, 80 %-ban, 85 %-ban, 90 %-ban, 95 %-ban, 96 %-ban, 97 %-ban, 98 %-ban vagy 99 %-ban vagy még nagyobb mértékben azonosak egy találmány szerinti polinukleotid-szekvenciával. Szakember számára kézenfekvő, hogy ezek az értékek - a kodonok degeneráltsága, az aminosavak hasonlósága, a leolvasási fázis pozicionálása és hasonló tényezők figyelembe vételével - a két nukleotid-szekvencia által kódol proteinek megfelelő azonosságának meghatározásához szükséges módon választhatók meg.

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

A találmány további megvalósítási módjai értelmében olyan polinukleotid-fragmenseket tárunk fel, amelyek a leírásban ismertetett egy vagy több szekvenciával azonos vagy komplementer szekvencia különböző hosszúságú, folytonos szakaszait tartalmazzák. Például, olyan polinukleotidokat tárunk fel, amelyek egy vagy több, fentebb leírt, találmány szerinti szekvencia legalább kb. 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 vagy 1000 vagy még több egymással szomszédos nukleotidját tartalmazzák (ideértve valamennyi köztes hosszúságú polinukleotidot is). A "köztes hosszúságú" kifejezés azt jelenti, hogy a polinukleotidok a megadott értékek közé eső számú nukleotidot is tartalmazhatnak, így pl. 16,

17, 18, 19, stb., 21, 22, 23, stb., 30, 31, 32, stb., 50, 51, 52, 53, stb., 100, 101, 102, 103, stb., 150, 151, 152, 153, stb. nukleotidot, továbbá 200 és 500, illetve 500 és 1000 között (és így tovább) valamennyi egész számú nukleotidot.

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

A találmány bizonyos előnyös megvalósítási módjai szerint a fentebb leírt polinukleotidok (pl. polinukleotid-változatok, -fragmensek és hibridizáló szekvenciák) olyan
20 polipeptideket kódolnak, amelyek immunológiailag reaktívak egy találmány szerinti polipeptid-szekvenciával. Az egyik előnyös megvalósítási mód értelmében az ilyen polinukleotidok olyan polipeptideket kódolnak, amelyek immunogén aktivitása legalább kb. 50 %-a, előnyösen legalább kb. 70 %-a, még előnyösebben legalább kb. 90 %-a egy találmány szerinti polipeptid-szekvencia immunogén aktivitásának.

25 A találmány szerinti polinukleotidok vagy fragmenseik - függetlenül a kódolószekvencia hosszúságától - egyéb DNS-szekvenciákkal (pl. promóterekkel, poliadenilációs szig-nálokkal, restrikciós enzimes felismerési helyekkel, többszörös klónozóhelyekkel, egyéb kódolószakaszokkal és hasonlókkal) kombinálhatók, oly módon, hogy teljes hosszúságukban jelentős mértékű különbségek lehetnek. Ilyenformán, csaknem bármilyen hosszúságú nukleinsav-fragmens alkalmazható, azzal, hogy a teljes hosszúságot az előállítás gyakorlati kivitelez-
30 hetősége és a tervezett rekombináns DNS-technológiában való alkalmazhatóság korlátozza. Például, a találmány számos gyakorlati megvalósításában hasznos polinukleotid-szakaszok teljes hosszúsága jellemzően kb. 10000, kb. 5000, kb. 3000, kb. 2000, kb. 1000, kb. 500, kb.

200, kb. 100, kb. 50 bázispár (ideértve valamennyi köztes hosszúságot).

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

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

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

A százalékos szekvencia-azonosság és -hasonlóság meghatározására alkalmas algoritmusok előnyös példjaként említhető a BLAST és a BLAST 2.0 algoritmus [leírásukat illetően ld. Altschul és mtsai.: Nucleic Acids Res. 25, 3389 (1977); illetve Altschul és mtsai.: J. Mol. Biol. 215, 403 (1990)]. A BLAST és BLAST 2.0 algoritmus - például, az általunk leírt

paraméterekkel - alkalmas a találmány szerinti polinukleotidok és polipeptidek százalékos szekvencia-azonosságának meghatározására. A BLAST-analízisek végrehajtására alkalmazható szoftver a National Center for Biotechnology Information intézeten keresztül mindenki számára hozzáférhető. Nukleotidszekvenciák esetében az összesített pontszám, például, az

5 "M" paraméter (egyező nukleotid-pár jutalom-pontszáma, minden esetben nagyobb, mint nulla) és az "N" paraméter (nem egyező nukleotidok büntető-pontszáma, minden esetben kisebb, mint nulla) alkalmazásával számítható ki. A szótalálatok kiterjedése - bármely irányban - akkor áll meg, ha a összesített pontszám a maximális elért értékéről "X" mennyiséggel csökken; ha az összesített pontszám nullára vagy az alá csökken (egy vagy több negatív pontszámú

10 nukleotid-megfeleltetés felhalmozódása miatt); vagy ha a szekvencia bármely végét elérjük. A BLAST-algoritmus paraméterei (W, T és X) határozzák meg az egymás alá rendezés érzékenységét és sebességét. A BLASTN-program (nukleotidszekvenciákhoz) alapértelmezésként 11-es szóhosszúságot (W), 10-es várható értéket használ, míg a BLOSUM62 pontozómátrix [ld. Henikoff és Henikoff: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915 (1989)] a következő paramétereket alkalmazza: egymás alá rendezések (B) = 50, várt érték (E) = 10, M = 5, N = -4

15 (mindkét szál összehasonlításával).

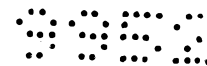
A "százalékos szekvencia-azonosságot" két, optimálisan egymás alá rendezett szekvencia legalább 20 pozícióból álló összehasonlítási ablakban történő összehasonlításával határozzuk meg. A polinukleotid-szekvencia összehasonlítási ablakba eső részlete - a két szekven-

20 cia optimális megfeleltetése érdekében - a deléciókat vagy addíciókat nem tartalmazó vonatkoztatási szekvenciához viszonyítva 20 %-ban vagy kisebb arányban, rendszerint 5-15 %-ban vagy 10-12 %-ban tartalmazhat addíciókat vagy deléciókat (azaz hézagokat). A százalékos azonosság kiszámításához meghatározzuk azon pozíciók számát, amelyekben mindkét szekvenciában azonos nukleinsav-bázis helyezkedik el, ezáltal megkapjuk az azonos pozíciók

25 számát. Ezt elosztjuk a vonatkoztatási szekvencia pozícióinak összes számával (vagyis az összehasonlítási ablak méretével), és százzal szorozva megkapjuk a százalékos azonosságot.

Szakember számára kézenfekvő, hogy a genetikai kód degeneráltsága miatt egy találmány szerinti polipeptidet több nukleotidszekvencia is kódolhat. E polinukleotidok közül néhány minimális mértékben homológ az adott polipeptidet kódoló natív génnel. Mindazon-

30 nálal, a kodonfelhasználás különbözőségei miatt változékony polinukleotidok szintén a találmány tárgyát képezik. Ezen túlmenően, a találmány szerinti polinukleotid-szekvenciákat tartalmazó gének alléljai szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak. Az allélok olyan endogén gének, amelyek egy vagy több mutáció (pl. deléciók, addíciók és/vagy szubsztitúciók)



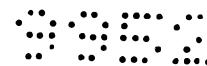
eredményeként módosítva vannak. Az allélok által kódolt mRNS és protein, bár nem szükségszerűen, módosított szerkezetű vagy funkciójú. Az allélok standard technikák (pl. hibridizáció, amplifikáció és/vagy adatbázisok szekvenciáinak összehasonlítása) alkalmazásával azonosíthatók.

5 Ennek megfelelően, a találmány egy további megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti polipeptidek immunogén változatainak és/vagy származékainak előállítására mutagenézist, például, helyspecifikus mutagenézist alkalmazunk. E módszerrel - a kódoló polinukleotid mutagenézise révén - a polipeptid-szekvencia specifikus módosításai hajthatók végre. E technikák a szekvencia-változatok előállításának és tesztelésének egyszerű módját
10 biztosítják (például, oly módon, hogy - a fenti megfontolások figyelembe vételével - a polinukleotidba egy vagy több nukleotidszekvencia-módosítást iktatunk be).

 A helyspecifikus mutagenézis lehetővé teszi a mutánsok létrehozását, melynek során a kívánt mutációnak megfelelő nukleotidokat és - annak érdekében, hogy a deléciós junkció mindkét oldalán stabil duplex létrehozásához megfelelő méretű és szekvencia-komplexitású
15 láncindítók álljanak rendelkezésre - kellő számú szomszédos nukleotidot tartalmazó, specifikus oligonukleotid-szekvenciákat alkalmazunk. A mutációk egy adott polinukleotid-szekvenciában magának a polinukleotid tulajdonságainak javítása, módosítása, csökkentése vagy bármely egyéb változtatása céljából és/vagy a kódolt polipeptid tulajdonságainak, aktivitásának, összetételének, stabilitásának vagy elsődleges szekvenciájának módosítása céljából
20 alkalmazhatók.

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

30 A helyspecifikus mutagenézises módszerek során gyakran olyan fágvektort alkalmazunk, amely egyszálú és kettős szálú alakban is létezik. A helyspecifikus mutagenézisre alkalmas vektorok egyik jellemző példája a kereskedelmi forgalomban beszerezhető M13-fág, melynek alkalmazhatósága szakember számára jól ismert. A helyspecifikus mutagenézis cél-

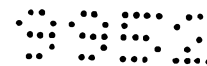


jaira széles körben elterjedt a kettős szálú plazmidok alkalmazása is, ami kiküszöböli a kívánt gén plazmidból fágba történő átvitelét.

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

A kisselektált, peptidet kódoló DNS-szakaszok szekvencia-változatainak helyspecifikus mutagenézis alkalmazásával történő előállítása lehetséges biztosít a potenciálisan hasznos változatok létrehozására, de ez nem jelent semmiféle korlátozást, mivel léteznek más módszerek is a peptidek szekvencia-változatainak (és az azokat kódoló DNS-szekvenciák) előállítására. Például, a kívánt peptidet kódoló rekombináns vektorokat mutagenizáló reagensekkel (pl. hidroxilaminnal) kezelhetjük, miáltal szekvencia-változatokhoz jutunk. Az e módszerek és eljárások részleteit illetően ld. Maloy és mtsai. (1994); Segal (1976); Prokop és Bajpai (1991); Kuby (1994); és Maniatis és mtsai. (1982); mely forrásokat teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk.

Ahogy itt használjuk, az "oligonukleotid-vezérelte mutagenizáló eljárás" kifejezés templát-dependens eljárásokra és vektor-közvetítette szaporításra vonatkozik, ami egy specifikus nukleinsav-molekula koncentrációjának - kezdeti koncentrációjához viszonyított - növekedését vagy egy detektálható jel (pl. amplifikáció) gyakoriságának növekedését eredményezi. Ahogy itt használjuk, az "oligonukleotid-vezérelte mutagenézises eljárás" kifejezésen olyan eljárást értünk, amely egy láncindító molekula templát-dependens meghosszabbítását foglalja magában. A "templát-dependens eljárás" kifejezés RNS- vagy DNS-molekula nukleinsav-szintézisére vonatkozik, azzal, hogy az újonnan szintetizált nukleinsav-szál szekvenciája a jól ismert komplementer bázispárosodási szabályok szerint épül fel [ld. pl. Watson (1987)]. A vektor-közvetítette eljárások általában a nukleinsav-fragmens DNS- vagy RNS-vektorba foglalását, a vektor klonális sokszorosítását és a sokszorosított (amplifikált) nukleinsav-fragmens



kinyerését foglalják magukban. Az ilyen eljárások példáit illetően ld. a 4 237 224 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást, melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk.

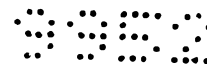
A találmány szerinti polipeptid-változatok előállításának egy másik módszere szerint a rekurzív szekvencia-rekombináció (ld. az 5 837 458 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást) alkalmazható. E módszer szerint a találmány szerinti egyedi (például, fokozott immunogén aktivitású) polinukleotid-változatok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

A találmány további megvalósítási módjai értelmében a találmány szerinti polinukleotidok nukleinsav-hibridizációs próbákként vagy láncindítókként alkalmazhatók előnyösen. Mint ilyen, azok a nukleinsav-szakaszok különösen alkalmasak, amelyek legalább 15 szomszédos nukleotidból álló szekvencia-régiót tartalmaznak, amely azonos vagy komplementer egy találmány szerinti, 15 nukleotidos, összefüggő szekvenciával. Bizonyos megvalósítási módokban a nagyobb hosszúságú (pl. kb. 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000 vagy bármely köztes számú nukleotidot tartalmazó, vagy akár teljes hosszúságú), azonos vagy komplementer szekvenciák is alkalmazhatók.

Az ilyen nukleinsav-próbák adott szekvenciához specifikusan hibridizáló képessége lehetővé teszi komplementer szekvenciák adott mintában történő kimutatására történő alkalmazásukat. Mindazonáltal, egyéb alkalmazásaik is lehetségesek; például, a szekvencia-információk felhasználása mutáns szekvencia láncindítóinak (vagy egyéb genetikai konstrukciók létrehozására alkalmazható láncindítók) előállítására.

Hibridizációs próbaként (pl. Southern-blot vagy Northern-blot analízisben) történő alkalmazás céljára különösen előnyösek az olyan polinukleotid-molekulák, amelyek 10-14, 15-20, 30, 50 vagy akár 100-200 nukleotidos - találmány szerinti polinukleotid-szekvenciával azonos vagy komplementer -, összefüggő nukleotidszekvencia-szakaszokból álló régiókat tartalmaznak. Az ilyen próbák lehetővé teszik egy géntermék (vagy fragmense) eltérő sejtípusokban és különböző baktériumsejtekben történő analízisét. A fragmens teljes hossza (és a komplementer szakasz(ok) mérete) az adott nukleinsav-szakasz tervezett alkalmazásától függ. A rövidebb fragmensek általában hibridizációs célokra alkalmasak (mely esetben az összefüggő komplementer régió hosszúsága változtatható, pl. kb. 15 és kb. 100 nukleotid között) de - a kimutatni kívánt komplementer szekvenciák hosszúságának megfelelően - nagyobb hosszúságú, összefüggő komplementer szakaszok is alkalmazhatók.

A kb. 15-25 nukleotidos hibridizációs próbák alkalmazása olyan duplex molekula kialakulását teszi lehetővé, amely egyaránt stabil és szelektív. Ennek ellenére, a hibrid stabilitá-



sának és szelektivitásának fokozása - és ezáltal a létrejött specifikus hibridmolekulák minősége - javítása érdekében, azok a molekulák előnyösek, amelyek 15 bázisnál hosszabb szakaszok mentén tartalmaznak összefüggő komplementer szekvenciákat. Általában olyan nukleinsav-molekulák tervezése előnyös, amelyek 15-25 (vagy még több) egymással szomszédos nukleotidból álló gén-komplementer szakaszokat tartalmaznak.

A hibridizációs próbák a találmány szerinti szekvenciák bármelyikének tetszőleges részletéből választhatók ki, csupán arra van szükség, hogy áttekintsük azokat a találmány szerinti szekvenciákat - vagy azok bármely, kb. 15-25 nukleotidtól a teljes hosszúságú szekvenciáig terjedő méretű (beleértve a teljes hosszúságú szekvenciát is) összefüggő részletét -, melyeket próbaként vagy láncindítóként kívánunk alkalmazni. A próba- vagy láncindító-szekvenciákat különféle tényezők alapján választjuk ki. Például, alkalmazhatunk olyan láncindítókat, melyek a teljes szekvencia végeiről származnak.

A rövid polinukleotid-szakaszok vagy -fragmensek egyszerűen előállíthatók, például, a fragmens kémiai módszerekkel történő közvetlen szintézisével, ami automata oligonukleotid-szintetizáló készülék alkalmazásával rutinszerű eljárás. A fragmensek nukleinsav-reprodukciós technika, például, polimeráz-láncreakció (PCR™, ld. 4 683 202 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás, melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk) alkalmazásával, kiválasztott szekvenciák rekombináns vektorokba történő beépítésével (rekombináns termeltetés céljából) vagy egyéb (molekuláris biológiában jártas szakember számára jól ismert) rekombináns DNS-technikák alkalmazásával is előállíthatók.

A találmány szerinti nukleotidszekvenciák azon képességük alapján is felhasználhatók, hogy a teljes gén (vagy a gén egy fragmense) komplementer szakaszaival szelektíven duplex-molekulákat hoznak létre. Az adott alkalmazástól függően, a próbák célszekvenciára irányuló, különböző mértékű szelektivitásának eléréséhez rendszerint különböző hibridizációs feltételeket alkalmazunk. A nagy szelektivitást igénylő alkalmazási területeken a hibridek kialakításához viszonylag nagyobb mértékben sztringens feltételekre van szükség, például, viszonylag alacsony sókoncentrációra és/vagy magas hőmérsékletre: pl. kb. 0,02-0,15 M sókoncentráció kb. 50-70 °C-on. Az ilyen szelektív feltételek a próba és a templát (vagy célszál) között minimális mennyiségű eltérést engednek meg, és különösen alkalmasak a rokon szekvenciák izolálására.

Bizonyos célokra - például, ha egy alapul szolgáló templáthoz hibridizáló mutáns láncindító-szál alkalmazásával kívánunk mutánsokat létrehozni -, kevésbé sztringens hibridizációs feltételeket alkalmazhatunk, hogy elősegítsük a heteroduplex kialakulását. Ilyen ese-

tekben kb. 0,15-0,9 M sókoncentrációt és kb. 20-55 °C-os hőmérsékletet alkalmazhatunk, ezáltal a kereszthibridizáló szekvenciák - pozitív hibridizációs jelekként - könnyen azonosíthatók (a kontroll hibridizációkhoz viszonyítva). Minden esetben érvényes, hogy a hibridizációs feltételek sztringenssége a formamid (amely hasonló módon destabilizálja a hibrid duplexet, mint a megnövelt hőmérséklet) koncentrációjának növelésével fokozható. Ilyen módszerekkel a hibridizációs feltételek - az elérni kívánt eredményektől függően - könnyen szabályozhatók.

A találmány egy további megvalósítási módja értelmében antiszensz oligonukleotidokat tartalmazó polinukleotidokat tárunk fel. Az antiszensz oligonukleotid bizonyítottan a proteinszintézis hatékony és célzott inhibitorai, s ezáltal terápiás lehetőséget nyújtanak, melynek értelmében egy betegség a kialakulásában szerepet játszó proteinek szintézisének gátlásával kezelhető. Az antiszensz oligonukleotidok proteinszintézis gátlásában megnyilvánuló hatékonysága jól ismert. Például, a poligalaktauronáz és a muszkarin (2. típusú acetilkolin receptor) szintézise a megfelelő mRNS-szekvenciákra specifikus antiszensz oligonukleotidokkal gátolható (ld. az 5 739 119 és 5 759 829 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat). Ezen túlmenően, az antiszensz gátlást a következők esetében is kimutatták: ciklin nevű sejtmagi protein, a multidrog-rezisztencia gén (MDG1), az ICAM-1, az E-szelektin, az STK-1, a corpus striatum GABAA-receptora és a humán EGF [ld. Jaskulski és mtsai.: Science 240, 1544 (1988); Vasanthakumar és Ahmed: Cancer Commun. 1(4), 225 (1989); Peris és mtsai.: Brain Res. Mol. Brain Res. 57(2), 310 (1998); és az 5 801 154, 5 789 573, 5 718 709 és 5 610 288 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírások]. Leírtak továbbá olyan antiszensz konstrukciókat, amelyek különféle rendellenes sejtprolifерációk (pl. rák) gátlására (és ezáltal kezelésére) alkalmasak (ld. az 5 747 470, 5 591 317 és 5 783 683 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat).

A találmány bizonyos megvalósítási módjai értelmében olyan oligonukleotid-szekvenciákat tárunk fel, amelyek egy találmány szerinti polinukleotid-szekvenciához - vagy komplementeréhez - specifikusan kötődni képes szekvencia egészét vagy részét tartalmazza. Az egyik megvalósítási mód szerint az antiszensz oligonukleotidok DNS-t vagy DNS-származékot tartalmaznak. Egy másik megvalósítási mód szerint az oligonukleotidok RNS-ek vagy RNS-származékok. Egy harmadik megvalósítási mód szerint az oligonukleotidok módosított DNS-ek, melyek foszforotioáttal módosított molekulavázatot tartalmaznak. Egy negyedik megvalósítási mód szerint az oligonukleotid-szekvenciák peptid-nukleinsavakat vagy azok származékait tartalmazzák. A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös

oligonukleotid-szekvenciák mindegyik esetben tartalmaznak olyan régiót, amely komplementer - előnyösebben lényegében komplementer, még előnyösebben teljes mértékben komplementer a találmány szerinti polinukleotid egy vagy több részletével. Az egy adott génszekvenciára specifikus antiszensz oligonukleotidok szelektálása a kiválasztott célszekvencia vizsgálatán és a másodlagos szerkezet, az olvadáspont (T_m), a kötési energia és a relatív stabilitás meghatározásán alapul. Az antiszensz oligonukleotidok szelektálhatók dimereket, hajtűhurkokat és egyéb másodlagos struktúrákat (melyek csökkenthetik vagy gátolhatják egy gazdasajtban a cél-mRNS-hez történő specifikus kötődést) létrehozó képességük relatív hiánya alapján. Az mRNS előnyös célrégiói az AUG transzlációs kezdőkodonnál vagy annak közelében lévő régiók és azok a szekvenciák, amelyek lényegében komplementerek az mRNS 5' - oldali régióival. A szóban forgó másodlagos szerkezet analízisek és célhely-szelekciók, például, az OLIGO láncindító-analizáló szoftver v.4-es változatának és/vagy a BLASTN 2.0.5 algoritmus szoftver [Altschul és mtsai.: Nucleic Acids Res. 25(17), 3389 (1997)] alkalmazásával hajthatók végre.

Szintén a találmány tárgyához tartozik egy rövid hordozópeptid (a 27 aminosavas MPG) felhasználásával végzett antiszensz célbajuttató eljárás alkalmazása is. Az MPG-peptid a HIV-gp41 fúziós szekvenciájából származó hidrofób domént és az SV40-eredetű T-antigén sejtmagi lokalizációért felelős szekvenciájából származó hidrofil domént tartalmaz [Morris és mtsai.: Nucleic Acids Res. 25(14), 2730 (1997)]. Kimutatták, hogy az MPG-peptid több molekulája is kötődik az antiszensz oligonukleotidokhoz, ezáltal azok viszonylag nagy (90 %-os) hatékonysággal, kevesebb, mint egy óra alatt bejuttathatók a tenyészetben tartott emlőseredetű sejtekbe. Ezen túlmenően, az MPG-peptiddel bekövetkező interakció jelentős mértékben fokozza az oligonukleotid nukleázos hasítással szembeni ellenállóképességét és a plazmamembránon áthatoló képességét.

A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti polinukleotidokat a találmány szerinti tumorpolipeptidek és tumorproteinek termelődésének tumorsejtekben történő gátlására alkalmas ribozim-molekulák tervezésére és előállítására alkalmazzuk. A ribozimok RNS-protein komplexek, amelyek helyspecifikus módon hasítják a nukleinsavakat. A ribozimok specifikus katalitikus doméneket tartalmaznak, melyek endonukleáz-aktivitással bírnak [Kim és Cech: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(24), 8788 (1987); Forster és Symons: Cell 49(2), 211 (1987)]. Például, nagyszámú ribozim nagy specifitással gyorsítja fel a foszfoészter-transzfer reakciókat, gyakran egy oligonukleotid-szubsztrát több foszfoészter-kötése közül csak egyet hasítva [Cech és mtsai.: Cell 27, 487

(1981); Michel és Westhof: J. Mol. Biol. 216, 585 (1990); Reinhold-Hurek és Shub: Nature 357, 173 (1992)]. Ez a specifitás annak tudható be, hogy a szubsztrát a kémiai reakciót megelőzően - specifikus bázispárosodási kölcsönhatások révén - a ribozim belső "útmutató" ("guide") szekvenciájához (IGS) kötődik.

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

A ribozimok enzimikus természete számos technikánál előnyösebb alkalmazást
tesz lehetővé [ilyen pl. az antiszensz technika (melynek során egy nukleinsav-molekula egy-
szerűen kötődik egy cél-nukleinsavhoz, gátolva ezáltal annak transzlációját), mivel a ribozim
20 gyógykezeléshez szükséges koncentrációja kisebb, mint egy antiszensz oligonukleotidé. Ez az
előny tükrözi a ribozim enzimikus aktivitást kifejtő képességét. Ennek megfelelően, egy
ribozim-molekula képes több cél-RNS-molekula hasítására, sőt, a ribozim rendkívül specifi-
kus inhibitor, melynek gátlási specifitása nemcsak a cél-RNS-hez történő kötődés bázispá-
rosodási mechanizmusától, hanem a cél-RNS hasításának mechanizmusától is függ. A hasítási
25 hely közelében lévő egyedüli hibás bázispárosodások vagy bázisszubsztitúciók teljes mérték-
ben megszüntethetik a ribozim katalitikus aktivitását [ld. Woolf és mtsai.: Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 89, 7305 (1992)]. Ilyenformán, egy ribozim hatásának specifitása nagyobb, mint az
ugyanazon RNS-helyhez kötődő antiszensz oligonukleotidé.

Az enzimikus aktivitású nukleinsav-molekulára a következő motívumok lehetnek
30 jellemzők: kalapácsfej, hajtű, hepatitis-δ vírus, I. csoportos intron vagy RNáz-P RNS (RNS
"guide" szekvenciával együtt) vagy neurospora VS RNS-motívum. A kalapácsfej-motívum
példáit Rossi és mtsai. [Nucleic Acids Res. 20, 4559 (1992)] írták le. A hajtű-motívumok leírá-
sát illetően ld. Hampel és mtsai.: EP 0360257 számon közzétett európai szabadalmi bejelen-

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

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

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

Sullivan és mtsai. a WO 94/02595 számú nemzetközi közzétételi iratban eltárták az enzimatis RNS-molekulák célbajuttatásának általános eljárásait. A ribozimok szakember számára jól ismert, különféle eljárások alkalmazásával juttathatók be a sejtekbe. E módszerek jellemző példái közé tartoznak, többek között, a liposzómákba foglalás, az iontoforézis vagy egyéb hordozókba (pl. hidrogélekben, ciklodextrinekbe, biológiaiilag lebontható nanokapszu-

lákba és bioadhezív mikrogömbökbe) történő ágyazás. Bizonyos indikációk esetén a ribozimok közvetlenül ex vivo juttathatók be a sejtekbe vagy szövetekbe (a fentebb említett hordozókkal együtt vagy azok nélkül). Más módon, az RNS/hordozó kombináció lokálisan juttatható be, pl. közvetlen inhalálással vagy közvetlen injekcióval vagy katéter, infúziós pumpa vagy stent alkalmazásával. A bejuttatás egyéb módjai közé tartozik, többek között, az intravaszkuláris, intramuszkuláris, szubkután vagy ízületi injekció, az aeroszol belélegeztetés, orális adagolás (tabletta vagy pirula alkalmazásával), valamint a topikus, szisztémás, okuláris, intraperitoneális és/vagy intrathecalis adagolás. A ribozimok célbejuttatásának és adagolásának részletes leírását illetően ld. a WO 94/02595 és WO 93/23569 számú nemzetközi közzétételi iratokat, melyeket teljes terjedelmükben a kitanítás részének tekintünk.

A ribozim(ok) nagy koncentrációjának sejtekben történő felhalmozásának egy másik lehetősége a ribozimot kódoló szekvenciák DNS-expressziós vektorba történő beépítése. A ribozim-szekvenciák transzkripcióját az eukarióta RNS-polimeráz-I, RNS-polimeráz-II vagy RNS-polimeráz-III (pol-I, pol-II, illetve pol-III) szabályozza. A pol-II- vagy pol-III-promóter szabályozása alatt létrejött transzkriptumok valamennyi sejtben nagy mennyiségben expresszálódnak; egy adott pol-II-promóter adott sejttypusban jelenlévő mennyisége a gén promóter közelében lévő szabályozószekvenciáinak (erősítőszekvenciák, stb.) természetétől függ. Prokarióta RNS-polimeráz promóterek szintén alkalmazhatók, feltéve, hogy a prokarióta RNS-polimeráz termelődik a megfelelő sejtekben. Az ilyen promóterek szabályozása alatt expresszált ribozimokról bebizonyosodott, hogy emlőseredetű sejtekben is működőképesek. Az ilyen transzkripciós egységeket számos különböző - emlőseredetű sejtekbe történő bejutatásra alkalmas - vektorba beépíthetjük, így például, többek között, plazmid-DNS-vektorokba, virális DNS-vektorokba (pl. adenovírus vagy adeno-asszociált vektorokba) vagy virális RNS-vektorokba (pl. retrovírus, semliki forest vírus vagy sindbis vírus vektorokba).

A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében peptid-nukleinsavakat (PNS-eket) tárunk fel. A PNS egy DNS-utánzó molekula, amelyben a nukleobázisok pszedopeptid-vázhoz kapcsolódnak [ld. Good és Nielsen: Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7(4), 431 (1997)]. A PNS számos olyan eljárásban alkalmazható, amelyben hagyományosan RNS vagy DNS használatos. Bizonyos eljárásokban a PNS-szekvenciák jobb teljesítményt nyújtanak, mint a megfelelő RNS- vagy DNS-szekvenciák, és RNS-re vagy DNS-re nem jellemző tulajdonságokkal bírnak. A PNS-sek előállítási eljárásainak, tulajdonságainak és alkalmazási eljárásainak összefoglaló áttekintését ld. Corey: Trends Biotechnol. 15(6), 224 (1997). Bizonyos megvalósítási módokban előállíthatunk olyan PNS-szekvenciákat, amelyek az ACE-

mRNS-szekvencia egy vagy több részletével komplementerek, és az ilyen PNS-ek az ACE-specifikus mRNS translációjának szabályozására, módosítására vagy csökkentésére, és ezáltal egy gazdasejtben az ACE-aktivitás módosítására alkalmazhatók.

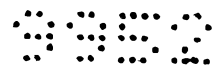
5 A PNS-ekben a DNS normál foszfodiészter-vázát 2-amino-etil-glicin kötések helyettesítik [Nielsen és mtsai.: Science 254, 1497 (1991); Hanvey és mtsai.: Science 258, 1481 (1992); Hyrup és Nielsen: Bioorg. Med. Chem. 4, 5 (1996)]. E szerkezetnek három lényeges következménye van: először is, ellentétben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

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

20 Egy adott PNS-szintézis sikere - csakúgy, mint a peptidszintézis esetében - a kiválasztott szekvencia tulajdonságaitól függ. Például, bár a PNS-ekbe a nukleotid-bázisok elméletileg bármely kombinációja beépíthető, a szomszédos purinok jelenléte a termékben egy vagy több gyök deléciójához vezethet. E probléma ismeretében a szomszédos purinokat tartalmazó PNS-ek előállítása esetén javasolható a valószínűleg sikertelenül hozzáadott gyökök kapcsolásának megismétlése. Ezt követően a RNS-eket reverz fázisú, nagyteljesítményű folyadékromatográfiával tisztíthatjuk, ami a peptidek szintézise esetén tapasztalhatóhoz hasonló hozamot és terméktisztaságot eredményez.

25 A PNS-ek adott célnak megfelelő módosításait az aminosavak szilárd fázisú szintézis során végzett hozzákapcsolásával vagy karboxilcsoportot tartalmazó vegyületek szabad N-terminális aminosavhoz történő kapcsolásával hajthatjuk végre. Más módon, a PNS-ek a szintézis után - a molekulába beépített lizinhez vagy ciszteinhez végzett kapcsolással - is módosíthatók.

30 A PNS-ek módosításainak egyszerűsége elősegíti jobb oldékonyságuknak vagy specifikus funkcionális követelményeknek megfelelő optimalizálásukat. Szintézist követően a PNS-ek és származékaik azonossága tömegspektrometriával ellenőrizhető. A PNS-ek módosításait és alkalmazásait illetően ld. pl. Norton és mtsai.: Bioorg. Med. Chem. 3(4), 437 (1995); Petersen



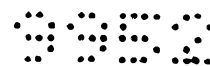
és mtsai.: J. Pept. Sci. 1(3), 175 (1995); Orum és mtsai.: Biotechniques 19(3), 472 (1995); Footer és mtsai.: Biochemistry 35, 10673 (1996); Griffith és mtsai.: Nucleic Acids Res. Pardridge és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5592 (1995); Boffa és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1901 (1995); Gambacorti-Passerini és mtsai.: Blood 88, 1411 (1996);
5 Armitage és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 12320 (1997); Seeger és mtsai.: Biotechniques 23, 512 (1997). Az 5 700 922 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban PNS-DNS-PNS kiméramolekulákat és alkalmazásukat tárják fel diagnosztikai célokra, proteinek organizmusban történő módosítására és gyógyszerekre érzékeny állapotok kezelésére.

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

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

20 Polinukleotidok azonosítása, karakterizálása és expresszáltatása

A találmány szerinti polinukleotidok azonosítására, előállítására és/vagy manipulálására a különféle, jól ismert technikák bármelyike alkalmazható [általános leírást ld. Sambrook és mtsai.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY (1989) és hasonló források]. Például, ahogy az alábbiakban részletesebben
25 ismertetjük, a polinukleotidok azonosítására cDNS-ek mikrosorozatának tumorasszociált expresszióra (azaz olyan expresszióra, amely - az itt bemutatott reprezentatív teszttel végzett meghatározás szerint - tumorban legalább kétszerese a normális szövetben megfigyelhetőnek) végzett szkrínelését alkalmazhatjuk. Az ilyen szkrínelési eljárások, például, az Affymetix, Inc. (Santa Clara, CA, USA) "microarray" technológiájának alkalmazásával, a gyártó útmutatásait
30 követve - és lényegében Schena és mtsai. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10614 (1996)] és Heller és mtsai. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2150 (1997)] leírása szerint - hajthatók végre. Más módon, a polinukleotidok találmány szerinti proteineket termelő sejtekből (pl. tumorsejtekből) készített cDNS-ből amplifikálhatók.



Egy mintában lévő célszekvenciák amplifikálására számos templát-dependens eljárás áll rendelkezésre. Az egyik legismertebb amplifikációs eljárás a polimeráz-láncreakció (PCRTM), melyet a 4 683 195, 5 683 202 és 4 800 159 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban tártak fel (melyeket teljes terjedelmükben a kitanítás részének tekintünk). A polimeráz-láncreakció során két láncindító-szekvenciát készítünk, melyek a célszekvencia komplementer szálaival komplementerek. A reakcióelegyhez DNS-polimerázzal (pl. Taq-polimerázzal) együtt, feleslegben dezoxinukleozid-trifoszfátokat adunk. Ha a mintában jelen van a célszekvencia, a láncindítók hozzá hibridizálódnak, és a polimeráz aktivitásának eredményeként a láncindítók - nukleotidok folyamatos hozzáadásával - a célszekvencia mentén meghosszabbodnak. A reakcióelegy hőmérsékletének növelésével és csökkentésével a meghosszabbodott láncindítók leválnak a célszekvenciáról (a reakcióterméket adva), és a feleslegben lévő láncindítók a célszekvenciához és a reakciótermékhez kötődnek, és a folyamat tovább ismétlődhet. Az amplifikálódott mRNS mennyiségének meghatározására előnyösen reverz transzkripcióval kombinált PCRTM-amplifikáció alkalmazható. A polimeráz-láncreakciós eljárások szakember számára jól ismertek.

Az idevonatkozó szakirodalomból számos egyéb templát-dependens eljárás is ismert, melyek közül sok a PCRTM-amplifikációs technika változata. Példaként említhető a ligáz-láncreakció (LCR; ld. pl. 320 308 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés és 4 883 750 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás), a Qbeta replikáz (ld. PCT/US87/00880), a szálkiszorításos amplifikáció ("strand displacement amplification", SDA) és a "repair" láncreakció (RCR). További amplifikációs eljárásokat illetően ld. a 2 202 328 számú nagy-britanniai szabadalmi bejelentést és a PCT/US89/01025 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentést. Az egyéb nukleinsav-amplifikációs eljárások közé tartoznak a transzkripció-alapú amplifikációs rendszerek (TAS; ld. WO 88/10315 számú nemzetközi közzétételi irat), mint pl. a nukleinsavszekvencia-alapú amplifikáció (NASBA) és a 3SR. A 329 822 számon közzétett európai szabadalmi bejelentésben olyan nukleinsav-amplifikációs eljárásokat tártak fel, amelyek egyszálú RNS, egyszálú DNS és kettős szálú DNS ciklikus szintézisét foglalják magukban. A WO 89/06700 számú nemzetközi közzétételi iratban nukleinsavszekvencia-amplifikációs sémát tártak fel, amely egy promóter/láncindító-szekvencia egyszálú cél-DNS-hez történő hibridizáltatásán, majd a szekvencia sok RNS-kópiájának transzkripcióját foglalja magában. Szakember számára további amplifikációs eljárások is ismeretesek, mint pl. a "RACE" (Frohman, 1990) és a "one sided" PCR (Ohara, 1989).

Egy találmány szerinti polinukleotid amplifikált részlete - jól ismert technikák alkalmazásával - felhasználható egy teljes hosszúságú gén megfelelő könyvtárból (pl. tumor-cDNS-könyvtárból) történő izolálására. Az ilyen eljárások során egy vagy több - amplifikációra alkalmas - polinukleotid-próba vagy láncindító alkalmazásával cDNS-könyvtárat vagy

5 genomi könyvtárat szkrínélünk. A könyvtárat előnyösen méret szerint szelektáljuk, hogy nagyobb méretű molekulákat tartalmazzon. A gének 5' - régióinak azonosítására szintén előnyös lehetnek a véletlenszerűen kiválasztott láncindítókkal készített ("random primed") könyvtárak is. A genomi könyvtárak az intronok kinyerésére és az 5' - szekvenciák meghosszabbítására alkalmazhatók előnyösen.

10 A hibridizációs eljárások során - jól ismert technikák alkalmazásával egy szekvencia-részletet (pl. "nick"-transzlációval vagy 32P-izotóppal végzett végjelöléssel) jelölünk meg, majd denaturált baktérium-kolóniákat (vagy fág-plakkokat tartalmazó sejtgyepet) hordozó filterek jelölt próbával végzett hibridizációjával bakteriális vagy bakteriofág-könyvtárat szkrínélünk [ld. Sambrook és mtsai.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring

15 Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY (1989)]. A hibridizáló kolóniákat vagy plakkokat szelektáljuk és szaporítjuk, majd további analízis céljára DNS-t izolálunk. A cDNS-klónok - a szekvencia-részletből létrehozott láncindító és a vektorból származó láncindító alkalmazásával végzett polimeráz-láncreakcióval - további szekvencia mennyiségi meghatározása céljából analizálhatók. Egy vagy több átfedő klón azonosítása érdekében restrikciós tér-

20 képek és részleges szekvenciák hozhatók létre. A teljes szekvencia standard technikák alkalmazásával - melyek deléciós klónok sorozatának létrehozását foglalhatják magukban - határozható meg. A kapott átfedő szekvenciák egyetlen összefüggő szekvenciává állíthatók össze. A megfelelő fragmensek szokványos eljárásokkal végzett egymáshoz ligálásával teljes hosszúságú cDNS-klón állítható elő.

25 Más módon, az amplifikációs technikák (pl. a fentebb leírtak) teljes hosszúságú kódolószekvencia részleges cDNS-szekvenciából történő létrehozására is alkalmazhatók. Az egyik ilyen amplifikációs technika az inverz PCR [ld. Triglia és mtsai.: Nucleic Acids Res. 16, 8186 (1988)], melynek során a gén ismert régiója egyik fragmensének előállítására restrikciós enzimeket alkalmazunk. Ezt a fragmenst később intramolekuláris ligálással gyűrűvé zárjuk,

30 majd az ismert régióból származó divergens láncindító oligonukleotidokkal végzett polimeráz-láncreakció templátjaként alkalmazzuk. Egy másik lehetőség szerint egy részleges szekvenciával szomszédos szekvenciák egy kapcsolószekvenciára specifikus, illetve egy ismert régióra specifikus láncindító alkalmazásával végzett amplifikációval nyerhetők vissza.

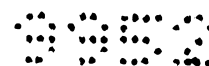
Ezen eljárás egyik változatát - melynek során két olyan láncindítót alkalmaznak, amelyek a lánchosszabbítást az ismert szekvenciából ellenkező irányban indítják be - a WO 96/38591 számú nemzetközi közzétételi iratban tárták fel. Egy másik hasonló technika a "cDNS-végek gyors amplifikációja" vagy "RACE" néven ismert eljárás. Ez a technika egy ismert szekvenciától 5' - és 3' -irányban lévő szekvenciák azonosítására egy belső és egy külső láncindítót alkalmaz, melyek egy poliA-régióhoz vagy vektorszekvenciához hibridizálnak. További hasonló eljárások a befogásos ("captured") polimeráz-láncreakció [Lagerstrom és mtsai.: PCR Methods Applic. 1, 111 (1991)] és a "walking" polimeráz-láncreakció [Parker és mtsai.: Nucleic Acids Res. 19, 3055 (1991)]. Teljes hosszúságú cDNS-szekvencia létrehozására egyéb - amplifikáció alkalmazásán alapuló - eljárások is alkalmazhatók.

Bizonyos esetekben EST-adatbázisokban (pl. a GenBank-ból hozzáférhetőben) lévő szekvenciák analízisével teljes hosszúságú cDNS-szekvencia nyerhető. Az átfedő EST-k keresését általában jól ismert programok (pl. NCBU BLAST keresőprogramok) alkalmazásával végezzük, és az így azonosított EST-k összefüggő, teljes hosszúságú szekvencia létrehozására alkalmazhatók. A teljes hosszúságú DNS-szekvenciák genomi szekvenciák analízisével is előállíthatók.

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

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

Ezen túlmenően, a találmány szerinti polinukleotid-szekvenciák a polipeptidet kódoló szekvenciák különböző okokból történő módosítása érdekében (például, többek között, a géntermék klónozása, érési folyamata és/vagy expressziója módosítása miatt) szakember számára jól ismert eljárások alkalmazásával génszabványi manipulációnak vethetők alá. Például, a



nukleotidszekvenciák genetikai manipulálására génfragmensek és szintetikus oligonukleotidok véletlenszerű fragmentálással végzett összekeverése és polimeráz-láncreakcióval végzett újrendezése alkalmazható. Ezenfelül, új restrikciós felismerési helyek inszertálására, a glikozilációs mintázatok módosítására, a kodon-preferencia megváltoztatására, "splicing"-
5 változatok létrehozása vagy mutációk beiktatása érdekében helyspecifikus mutagenezist végezhetünk.

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

15 A kívánt polipeptidet kódoló szekvenciák - teljes egészükben vagy részben - kémiai eljárásokkal szintetizálhatók [ld. pl. Caruthers és mtsai.: Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215, (1980); Horn és mtsai.: Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232 (1980)]. Más módon, kémiai eljárások alkalmazásával magát a proteint is szintetizálhatjuk. Például, a peptidszintézist különféle szilárd fázisú technikák alkalmazásával végezhetjük [Roberge és mtsai.: Science 269,
20 202 (1995)], és automata peptidszintetizáló készüléket (pl. ABI 431 típusú peptidszintetizátor; Perkin Elmer, Palo Alto, CA) is alkalmazhatunk.

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

Egy kívánt polipeptid expresszáltatása érdekében a polipeptidet kódoló nukleotid-szekvenciák - vagy funkcionális megfelelőik - alkalmas (azaz az inszertált kódolószekvencia transzkripciójához és transzlációjához szükséges elemeket tartalmazó) expressziós vektorba inszertálhatók. A polipeptideket kódoló szekvenciákat és megfelelő transzkripciós és transzlációs szabályozóelemeket tartalmazó expressziós vektorok létrehozására szakember számára
30

jól ismert, standard eljárások alkalmazhatók. E módszerek közé tartoznak az in vitro rekombináns DNS-technikák, szintézises technikák és in vivo genetikai rekombinációs technikák, melyek leírását illetően ld. pl. Sambrook és mtsai.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. (1989); és Ausubel és mtsai.: "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, New York, N.Y. (1989)].

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

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

Bakteriális rendszerekben - a termeltetett polipeptid tervezett felhasználásától függően - sokféle expressziós vektor alkalmazható. Például, ha a polipeptid nagy mennyiségének termeltetésére van szükség (pl. antitestek indukálása céljából), olyan vektorok alkalmazhatók előnyösen, amelyek könnyen tisztítható fúziós proteinek nagy mennyiségben történő termelését eredményezik. Az ilyen vektorok közé tartoznak, többek között, a multifunkcionális E. coli klónozó és expressziós vektorok, mint pl. a BLUESCRIPT-vektor (Stratagene), amelybe a

kérdéses polipeptidet kódoló szekvencia a β -galaktozidáz N-terminális metioninját és azt követő hét aminosavát kódoló szekvenciával azonos leolvasási fázisban inszertálható, miáltal hibrid protein termelődik; a pIN-vektorok [Van Heeke és Schuster: J. Biol. Chem. 264, 5503 (1989)], és hasonló. A pGEX-vektorok (Promega, Madison, Wis., USA) szintén alkalmasak idegen polipeptidek glutation S-transzferázzal (GST) alkotott fúziós proteinjeinek termeltetésére. Az ilyen fúziós proteinek általában oldékonyak, és feltárt sejtekből - glutation-agaróz gyöngyökön végzett adszorpcióval, majd szabad glutation jelenlétében történő eluálással - egyszerűen tisztíthatók. Az ilyen rendszerekben előállított proteinek úgy tervezhetők meg, hogy heparin, trombin vagy Xa-faktor proteázos hasítási helyeket tartalmazzanak, miáltal a klónozott polipeptid könnyen lehasítható a GST-ről.

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

Növényi expressziós vektorok alkalmazása esetén a polipeptideket kódoló szekvenciák expressziójának szabályozására számos promóter alkalmazható. Például, virális promóterek (pl. a karfiolmozaikvírus 35S- és 19S-promótere) önmagukban vagy a TMV-ből származó omega-vezetőszekvenciával [Takamatsu: EMBO J. 6, 307 (1987)] kombinálva alkalmazhatók. Más módon, alkalmazhatunk növényi promótereket is, mint pl. a RUBISCO kis alegységét vagy hősokk-promótereket [ld. Coruzzi és mtsai.: EMBO J. 3, 1671 (1984); Broglie és mtsai.: Science 224, 838 (1984); Winter és mtsai.: Results Probl. Cell Differ. 17, 85 (1991)]. Ezek a konstrukciók közvetlen DNS-transzformációval vagy patogén-közvetítette transzfekcióval juttathatók be a növényi sejtekbe. Az e célra alkalmas technikák leírása számos forrásban megtalálható [ld. pl. Hobbs vagy Murry, a McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (McGraw Hill, New York, N.Y., 1992) 191-196. oldalain].

Polipeptid termeltetésére rovarsejt-rendszer is alkalmazható. Például, az egyik ilyen rendszerben idegen gének *Spodoptera frugiperda* sejtekben vagy *Trichoplusia* lárvákban történő expresszáltatására alkalmas vektorként *Autographa californica* sejtmagi poliherdózis vírust (AcNPV) alkalmazunk. A polipeptidet kódoló szekvenciák a vírus nem esszenciális régiójába (pl. a poliherdinin-génbe), a poliherdinin-promóter szabályozása alá klónozhatók. A polipeptidet kódoló szekvencia sikeres inszerciója a poliherdinin gént inaktívvá tesz, és burokprotein nélküli rekombináns vírus létrejöttét eredményezi. Ezt követően a rekombináns vírusokkal, például,



S. frugiperda sejtek vagy Trichoplusia lárvák fertőzhetőek meg, és a kívánt polipeptid ezekben termeltethető [Engelhard és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 3224 (1994)].

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

A kívánt polipeptidet kódoló szekvenciák hatékonyabb transzlációja érdekében specifikus iniciációs szignálok is alkalmazhatók; ezek közé tartozik az ATG kezdőkodon és szomszédos szekvenciák. Ha a polipeptidet kódoló szekvenciákat, a kezdőkodont és az 5' -irányban lévő szekvenciákat megfelelő expressziós vektorba inszertáljuk, nincs szükség további transzkripció vagy transzláció szabályozószekvenciákra, ha azonban csak a kódolószekvenciát (vagy annak egy részét) inszertáljuk a vektorba, exogén transzlációs szabályozószignálok (pl. ATG kezdőkodon) beiktatására van szükség. Ezen túlmenően, a teljes inszertált szekvencia transzlációjának biztosításához a kezdőkodonnak a kódolószekvenciával azonos leolvasási fázisban kell lennie. Az exogén transzlációs elemek és kezdőkodonok természetes vagy szintetikus eredetűek egyaránt lehetnek. Az expresszió hatékonysága olyan erősítőszekvenciák alkalmazásával fokozható, amelyek az adott sejttrendszer számára megfelelőek [ld. pl. Scharf és mtsai.: Results Probl. Cell Differ. 20, 125 (1994)].

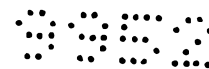
A gazdasejt-törzset az inszertált szekvenciák expresszióját módosító képessége vagy az expresszált protein érését kívánt módon végrehajtó képessége alapján is kiválaszthatjuk. A polipeptidek módosításainak példái közé tartozik, többek között, az acetilálás, karboxilálás, glikozilálás, foszforilálás,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

A rekombináns proteinek hosszú időtartamú, nagy hozamú termeltetésére előnyösen általában stabil expressziót alkalmazunk. Például, egy adott polinukleotidot stabilan

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

A transzformált sejtvonalak kinyerésére számos különféle szelekciós rendszer alkalmazható. Ezek példái közé tartozik, többek között, a herpes simplex vírus timidin kináz génje [Wigler és mtsai.: Cell 11, 223 (1977)] és adenin foszforiboziltranszferáz génje [Lowy és mtsai.: Cell 22, 817 (1990)], melyek tk.sup.-, illetve aprt.sup.- sejtekben alkalmazhatók. A szelekció antimetabolit-, antibiotikum- vagy herbicid-rezisztencia alapján is végrehajtható, például, a dhfr-gén a metotrexáttal szemben [Wigler és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 3567 (1980)]; az npt-gén az aminoglikozidokkal, neomicinnel és G-418-cal szemben [Colbere-Garapin és mtsai.: J. Mol. Biol. 150, 1 (1981)], míg az als- és pat-gén a klórszulfuronnal, illetve foszfinotricin acetiltranszferázzal szemben nyújt rezisztenciát (Murry, ld. fentebb). További szelektálható géneket is leírtak, mint pl. a trpB, amely a sejtek számára lehetővé teszi a triptofán helyett az indol felhasználását, valamint a hisD, amely hisztidin helyett hisztinolfelhasználást tesz lehetővé [Hartman és Mulligan: Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 8047 (1988)]. A látható markerek alkalmazása nagy népszerűséget szerzett az olyan markereknek, mint az antocianinok, béta-glükuronidáz és szubsztrátja, a GUS, a luciferáz és szubsztrátja, a luciferin, melyek nem csupán transzformánsok azonosítására, de a specifikus vektor-rendszereknek tulajdonítható - átmeneti vagy stabil - protein-termelődés mennyiségi meghatározására is alkalmazhatók [Rhodes és mtsai.: Methods Mol. Biol. 55, 121 (1995)].

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



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

A polinukleotid-kódolta termékek expressziójának kimutatására és mennyiségi meg-
határozására számos - poliklonális vagy monoklonális antitestek alkalmazásán alapuló - eljá-
rás ismeretes, melyek példái közé tartozik az enzimkött immunszorbens vizsgálati eljárás
10 (ELISA), a radioimmuneszt (RIA) és a fluoreszcens aktiválásos sejtosztályozás (FACS). Bi-
zonyos esetekben - egy adott polipeptid két, egymást nem befolyásoló epitópjával reaktív
monoklonális antitesteket alkalmazó - két helyes, monoklonális alapú immuneszt alkalmaz-
ható, de kompetitív kötési teszt is végezhető. A felsorolt és egyéb vizsgálati eljárások leírását
illetően ld. pl. Hampton és mtsai.: "Serological Methods, A Laboratory Manual", APS Press,
15 St. Paul, Minn., USA (1990); és Maddox és mtsai.: J. Exp. Med. 158, 1211 (1983).

A különféle nukleinsav- és aminosav-tesztekben számos jelölő és konjugációs tech-
nika alkalmazható. A polinukleotidokkal összefüggő szekvenciák kimutatására alkalmas, je-
lölt hibridizációs vagy PCR-próbák előállításának módjai közé tartozik az oligonukleotid-
jelölés, a "nick"-transzláció, a végjelölés vagy a jelölt nukleotid alkalmazásával végzett PCR-
20 amplifikáció. Más módon, a szekvenciák vagy részleteik mRNS-próba előállítása céljából
vektorba klónozhatók. Az ilyen vektorok szakember számára jól ismertek, kereskedelmi for-
galomban beszerezhetők, és megfelelő RNS-polimerázok (pl. T7, T3 vagy SP6) és jelölt
nukleotidok hozzáadásával RNS-próbák in vitro szintézisére alkalmazhatók. Ezek az eljárások
kereskedelmi forgalomban beszerezhető reagenskészletek alkalmazásával hajthatók végre. Az
25 ilyen célra alkalmas riporter-molekulák vagy jelölők közé tartoznak a radionuklidok, enzimek,
fluoreszcens, kemilumineszcens vagy kromogén reagensek, valamint szubsztrátok, kofakto-
rok, inhibitorok, mágneses részecskék és hasonlók.

A kívánt polinukleotid-szekvenciával transzformált gazdasejteket feltételek mellett
tenyésztjük, amelyek alkalmasak a proteinek sejtenyészetből történő kivonására. A rekombi-
30 nans sejt az általa termelt proteint - az alkalmazott szekvenciától és/vagy vektortól függően -
a tápközegbe kiválasztja vagy intracellulárisan felhalmozza. Ahogy az szakember számára jól
ismert, a találmány szerinti polinukleotidokat tartalmazó expressziós vektorok úgy alakíthatók
ki, hogy a kódolt polipeptid - prokarióta vagy eukarióta sejtmembránon keresztüli szekrécióját



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

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

Antitestek, antitest-fragmensek és egyéb kötőreagensek

A találmány egy következő szempontjának megfelelően olyan kötőreagenseket (pl. antitesteket és antigénkötő-fragmenseket) tárunk fel, amelyek találmány szerinti tumorpoli-peptidhez (vagy részletéhez, változatához vagy származékához) immunológiailag kötődnek. Egy antitest vagy antigénkötő-fragmensére akkor érvényes, hogy egy találmány szerinti polipeptidhez "specifikusan kötődik", "immunológiailag kötődik" és/vagy "immunológiailag reaktív", ha a polipeptiddel - pl. ELISA-teszt alkalmazásával - kimutatható mértékben reagál, más polipeptidekkel (hasonló feltételek mellett) azonban nem ad kimutatható reakciót.

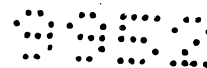
Ahogy itt használjuk, az "immunológiai kötődés" kifejezés olyan típusú nem kovalens kölcsönhatásokra vonatkozik, melyek immunglobulin-molekula és egy antigén (amelyre



az immunglobulin specifikus) között következnek be. Az immunológiai kötési kölcsönhatások erőssége (vagy affinitása) a kölcsönhatás disszociációs állandójával (K_d) fejezhető ki: a kisebb K_d -érték nagyobb affinitást jelent. A polipeptidek immunológiai kötési tulajdonságai szakember számára jól ismert eljárások alkalmazásával határozhatók meg. Az egyik módszer szerint az antigénkötőhely és az antigén közötti komplex kialakulásának és disszociációjának sebességét mérjük, melyek a komplexalkotó partnerek koncentrációjától, a kölcsönhatás affinitásától és - a sebességet mindkét irányban befolyásoló - geometriai paraméterektől függnék. Ilyenformán, a koncentrációk és az asszociáció és disszociáció aktuális sebességének kiszámításával az asszociációs sebességi állandó (K_{on}) és a disszociációs sebességi állandó (K_{off}) egyaránt meghatározható. A K_{off}/K_{on} arány lehetővé teszi az affinitással nem összefüggő valamennyi paraméter érvénytelenítését, s így egyenlő a disszociációs állandóval (K_d). Általános áttekintést illetően ld. Davies és mtsai.: Annual Rev. Biochem. 59, 439 (1990).

Egy antitest "antigénkötő helye" vagy "antigénkötő részlete" az immunglobulin azon része, amely részt vesz az antigén megkötésében. Az antigénkötő helyet a nehéz (H) és könnyű (L) láncok N-terminális variábilis (V) régióinak aminosavai alkotják. A nehéz és könnyű láncok variábilis régióinak három igen változékony szakaszát "hipervariábilis régióknak" nevezzük, melyek között állandóbb (konzervált) szakaszok helyezkednek el: ezek az úgynevezett vázrégiók (FR). Ilyenformán, az "FR-régió" kifejezés olyan aminosav-szekvenciára vonatkozik, amely természetes állapotban az immunglobulinok hipervariábilis régiói között helyezkedik el (és azokkal szomszédos). Egy antitest-molekulában a könnyű lánc és a nehéz lánc három-három hipervariábilis régiója - a háromdimenziós térben egymáshoz képest megfelelő módon elhelyezkedve - alkotja az antigénkötő felületet. Az antigénkötő felület komplementer egy megkötött antigén háromdimenziós felületével, és a nehéz, illetve könnyű lánc három-három hipervariábilis régióját komplementaritást meghatározó régióknak (CDR) nevezzük.

A kötőreagensek a leírásban bemutatott reprezentatív vizsgálati eljárások alkalmazásával hasznosak lehetnek a rákos (pl. emlőrákos) és nem rákos páciensek megkülönböztetésére. Például, egy tumorproteinhez kötődő antitestek vagy más kötőreagensek előnyösen olyan jelet generálnak, amelyek a rákos betegek legalább kb. 20 %-ában, előnyösebben legalább kb. 30 %-ában jelzik a rák jelenlétét. Más módon, vagy ezen túlmenően, az antitest olyan negatív jelet generál, amely a nem rákos személyek legalább kb. 90 %-ában a betegség hiányát jelzi. Annak meghatározása érdekében, hogy egy kötőreagens kielégíti-e ezt a követelményt, standard klinikai tesztek tanúsága alapján rákosnak, illetve nem rákosnak diagnosztizált szemé-



lyekből származó biológiai mintákat (pl. vért, vérsavót, köpetet, vizeletet és/vagy tumorbiopsziát) a leírásban ismertetett módon a kötőreagenshez kötődő polipeptidek jelenlétére tesztek. Előnyösen a rákos és nem rákos személyek statisztikailag szignifikáns számú mintáját teszteljük. A kötőreagenseknek meg kell felelniük a fenti követelményeknek, azonban - ahogy
5 az szakember számára kézenfekvő - a kötőreagens, érzékenységük javítása érdekében, egymással kombinálva is alkalmazhatók.

A fenti követelményeket kielégítő bármely reagens lehet kötőreagens. Például, kötőreagens lehet riboszóma (peptidkomponenssel együtt vagy anélkül), RNS-molekula vagy polipeptid. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a kötőreagens antitest vagy
10 annak antigénkötő fragmense. Az antitestek előállítására a szakember számára jól ismert technikák bármelyike alkalmazható [ld. pl. Harlow és Lane: "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]. Az antitesteket általában sejtenyésztési technikákkal állítjuk elő (ideértve pl. a monoklonális antitestek leírásban ismertetett előállítási módját), vagy más módon, az antitest génjeit megfelelő bakteriális vagy emlőseredetű gazdasejtbe
15 transzfektáljuk, lehetővé téve ezáltal a rekombináns antitestek termelődését. Az egyik eljárás szerint a polipeptidet tartalmazó immunogént először megfelelő emlőszállatba (pl. egérbe, patkányba, nyúlba, juhba vagy kecskébe) injektáljuk (e lépésben a találmány szerinti polipeptidek módosítás nélkül immunogénként szolgálhatnak). Más módon, különösen a viszonylag rövid polipeptidek esetében, rendkívül erős immunreakciót válthatunk ki, ha a polipeptidet hordozóproteinhez (pl. szarvasmarha-szérumalbuminhoz vagy "keyhole limpet" hemocianinhoz)
20 kapcsoljuk. Az immunogént a gazdaállatba injektáljuk (előnyösen előre meghatározott séma szerint, egy vagy több emlékeztetőoltás beiktatásával), majd az állatoktól megfelelő időközönként vért veszünk. A polipeptidre specifikus poliklonális antitestek az így kapott antiszérumból, például, affinitási kromatográfiával, az állat immunizálására alkalmazott - megfelelő
25 szilárd hordozóhoz kapcsolt - polipeptid alkalmazásával tisztíthatók.

Egy adott antigénhatású polipeptidre specifikus monoklonális antitestek, például, a Kohler és Milstein [Eur. J. Immunol. 6, 511 (1976)] által leírt technika (és annak javított változatai) alkalmazásával állíthatók elő. Az ilyen eljárások a kívánt specifitású (pl. a kívánt polipeptidre reaktív) antitestek termelésére képes, immortalizált sejtvonalak létrehozásán alapulnak. Az ilyen sejtvonalak, például, a fentebb leírtak szerint immunizált állatból származó
30 lépsejtekből hozhatók létre. A lépsejtek - fúziós partnerként, például, az immunizált állatra nézve szingénes myelomasejtekkel végzett - fuzionáltatással immortalizálhatók. A fuzionáltatás különféle technikákkal hajthatók végre. Például, a lépsejteket és myelomasejteket néhány

percre nemionos detergenssel elegyítjük, majd kis sűrűségben szelektív tápközegre szélesztjük, amely csak a hibrid sejtek szaporodását segíti elő, a myelomasejteket nem. Az egyik előnyös eljárás szerint HAT (hipoxanthin, aminopterin, timidin) szelekciót alkalmazunk. Megfelelő idő (rendszerint kb. 1-2 hét) elteltével a táptalajon a hibridek telepei figyelhetők meg.

- 5 Különálló telepeket szelektálunk, és tenyészeti felülűszóikat a polipeptidre vonatkozó kötési aktivitásra teszteljük. Azokat a hibridómákat részesítjük előnyben, amelyek nagy reaktivitásúak és specifitásúak.

- 10 A monoklonális antitesteket a növekvő hibridóma-telepek felülűszóiból izolálhatjuk. A hozam növelésére különböző módszerek állnak rendelkezésre (pl. a hibridóma-sejtvonalat megfelelő gerinces gazdaállat, például, egér hasüregébe injektáljuk, majd a hasúri folyadékból vagy a vérből monoklonális antitesteket izolálunk. Az antitestektől a szennyezéseket hagyományos módszerekkel, például, kromatográfiával, gélszűréssel, precipitációval vagy extrakcióval választhatjuk el. A találmány szerinti polipeptidek, például, az affinitási kromatográfiás lépés során alkalmazhatók.

- 15 Szakember számára számos olyan - terápiás szempontból hasznos - molekula ismert, amely egy antitest-molekula immunológiai kötési tulajdonságaival bíró antigénkötő helyeket tartalmaz. A papain nevű proteolitikus enzim elsősorban az IgG-molekulákat hasítja, miáltal több fragmens jön létre, melyek közül kettő - az F(ab)-fragmensek - egy-egy kovalens heterodimert tartalmaz, amely teljes antigénkötő helyet foglal magában. A pepszin az IgG-molekulákat oly módon hasítja, hogy több fragmens, köztük az F(ab')₂-fragmens jön létre, amely mindkét antigénkötő helyet tartalmazza. Fv-fragmens elsősorban az IgM-molekulák (és ritka esetekben az IgG- és IgA-molekulák) proteolitikus hasításával hozható létre, azonban az Fv-fragmensek gyakrabban szokványos rekombináns technikákkal származtathatók. Az Fv-fragmens egy nem kovalens VH::VL heterodimer, amely a natív antitest-molekula
20 antigénfelismerési és antigénkötési sajátságainak többségét megtartó antigénkötő helyet tartalmaz [ld. Inbar és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2659 (1972) Hochman és mtsai.: Biochem. 15, 2706 (1976); és Ehrlich és mtsai.: Biochem. 19, 4091 (1980)].

- 25 Az egyláncú Fv (sFv) polipeptid egy kovalens kötésű VH::VL heterodimer, amely peptidkódoló kapcsolószekvenciával összekapcsolt - VH-láncot és VL-láncot kódoló - géneket magában foglaló génfüzióból expresszáltatható. Huston és mtsai. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879 (1988)]. Több eljárást is leírtak a kémiai struktúrák megkülönböztetésére, amelyek egy antitest variábilis régiójából származó, természetesen aggregálódott - de kémiai úton szétválasztott - könnyű és nehéz polipeptid-láncok scFv-molekulává (amely egy

antigénköti hely szerkezetéhez lényegében hasonló háromdimenziós struktúrává hajtogatódik) történő átalakítására alkalmazhatók [ld. pl. az 5 091 513, 5 312 405 és 4 946 778 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást].

A fentebb leírt molekulák mindegyike tartalmaz egy nehéz lánc és egy könnyű lánc CDR-készletet, melyek egymáshoz viszonyított térbeli elhelyezkedését a közöttük lévő nehéz lánc és könnyű lánc FR-készlet biztosítja. Ahogy itt használjuk, a "CDR-készlet" kifejezés a nehéz, illetve könnyű lánc variábilis régiójának három hipervariábilis régiójára vonatkozik. A nehéz vagy könnyű lánc N-terminálisától kiindulva ezeket CDR1-nek, CDR2-nek, illetve CDR3-nak nevezzük. Ennek megfelelően, egy antigénköti hely hat komplementaritást meghatározó régiót tartalmaz (a nehéz lánc variábilis régiójának és a könnyű lánc variábilis régiójának három-három CDR-régióját). Az egyetlen komplementaritást meghatározó régiót (CDR1-et, CDR2-t vagy CDR3-at) tartalmazó polipeptidet "molekuláris felismerési egységnek" nevezzük. Több antigén-antitest komplex krisztallográfiás vizsgálata alapján bebizonyosodott, hogy a komplementaritást meghatározó régiók aminosavai kiterjedt kontaktusban állnak a megkötött antigénnel; a legkiterjedtebb antigén-kontaktus a nehéz lánc CDR3-régiójával alakul ki. Ilyenformán, egy antigénköti hely specifikusért elsősorban a molekuláris felismerési egységek felelősek.

Ahogy itt használjuk, az "FR-készlet" kifejezés négy szegélyező aminosav-szekvenciára vonatkozik, amelyek egy nehéz vagy könnyű lánc variábilis régiójának CDR-készletébe tartozó komplementaritást meghatározó régiókat foglalják keretbe. A vázrégió néhány aminosava kontaktusban állhat a megkötött antigénnel, azonban a vázrégiók (és különösen azok komplementaritást meghatározó régiókkal közvetlenül szomszédos aminosavai) elsősorban azért felelősek, hogy a variábilis régió antigénköti helyé hajtogatódjon. A vázrégiókon belül bizonyos aminosavak és bizonyos strukturális jellemzők nagyon állandóak (konzerváltak). Valamennyi variábilis régió szekvencia tartalmaz egy kb. 90 aminosavas belső diszulfidhurokot. Ha a variábilis régiók köti helyé hajtogatódnak, a komplementaritást meghatározó régiók kiálló hurokmotívumként jelennek meg, melyek antigénköti felületet alkotnak. Általánosan elfogadott, hogy a vázrégiók olyan konzervált strukturális régiókat tartalmaznak, amelyek befolyásolják a CDR-hurokok bizonyos "kanonikus" struktúrákká hajtogatódott alakját. Ezen túlmenően, a vázrégió bizonyos aminosavairól ismeretes, hogy domének közötti nem kovalens kontaktusokban vesznek részt, amelyek stabilizálják az antitest nehéz és könnyű lánc közötti interakciót.

Számos "humanizált" antitest-molekulát írtak le, amelyek nem humán immunglobulinból származó antigénköti helyet tartalmaznak; ilyenek például a rágsálóeredetű variábilis régiókat és az azokhoz kapcsolt komplementaritást meghatározó régiókat - humán konstans doménekhez fuzionálva - tartalmazó kiméra antitestek [Winter és mtsai.: Nature 349, 293
5 (1991); Lobuglio és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 4220 (1989); Shaw és mtsai.: J. Immunol. 138, 4534 (1987); Brown és mtsai.: Cancer Res. 47, 3577 (1987)]; a megfelelő humán antitest konstans doménjével végzett fuzionáltatás előtt humán vázrégióba átültetett rágsálóeredetű CDR-régiókat tartalmazó kiméra antitestek [ld. Riechmann és mtsai.: Nature 332, 323 (1988); Verhoeven és mtsai.: Science 239, 1534 (1988); és Jones és mtsai.: Nature
10 321, 522 (1986)]; valamint a rekombináns módszerekkel álcázott ("veneered") rágsálóeredetű vázrégiók által összekapcsolt rágsálóeredetű komplementaritást meghatározó régiókat tartalmazó kiméra antitestek (ld. az 519 596 számon közzétett európai szabadalmi bejelentést). Az ilyen "humanizált" molekulák úgy vannak megtervezve, hogy minimálisra csökkenjenek a rágsálóeredetű anti-humán antitest-molekulákra irányuló nem kívánatos immunreakciók, melyek korlátozzák az ilyen molekulák humán terápiai alkalmazásának hatékonyságát.
15

Ahogy itt használjuk, a "álcázott vázrégiók" és "rekombináns módszerekkel álcázott vázrégiók" kifejezések, például, a rágsálóeredetű nehéz vagy könnyű lánc variábilis régiójában lévő FR-aminosavak humán FR-aminosavakkal történő szelektív helyettesítésére vonatkoznak, melynek célja olyan xenogén molekula létrehozása, amelynek antigénköti helye a
20 natív FR-polipeptid hajtogatódási ("folding") struktúrájának lényegében egészét megtartja. A "álcázási" technikák azon a felismerésen alapulnak, hogy egy antigénköti hely ligandumköti tulajdonságait elsősorban a nehéz és könnyű láncok CDR-készleteinek antigénköti felületen belüli szerkezete és relatív elrendeződése határozza meg [Davies és mtsai.: Ann. Rev. Biochem. 59, 439 (1990)]. Ennek megfelelően, egy humanizált antitestben az antigénköti
25 specifitás csak akkor tartható fenn, ha nagy gondossággal megtartjuk a CDR-struktúrákat, egymás közötti interakcióikat és a variábilis régió többi doménjével megvalósuló interakcióikat. Az immunrendszerrel könnyen kontaktusba kerülő külső (oldószer számára hozzáférhető) FR-aminosavak a álcázási technikák alkalmazásával szelektíven humán aminosavakkal helyettesíthetők, miáltal gyenge immunogenitású (vagy lényegében nem immunogén), álcázott
30 felszínű hibridmolekula jön létre.

A álcázási technika végrehajtásához szükség van a humán antitestek variábilis doménjeinek hozzáférhető szekvencia-adataira [ld. Kabat és mtsai.: "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 4. kiadás, U.S. Dept. of Health and Human Services, U.S.

Government Printing Office (1987), a Kabat-féle adatbázis felfrissített változatát, illetve egyéb, egyesült államokbeli és külföldi nukleinsav- és aminosav-szekvencia adatbázisokat]. A variábilis régió aminosavainak oldószer-hozzáférhetőségére a humán és egéredetű antitest-fragmensek ismert háromdimenziós szerkezetéből következtethetünk. Az egéredetű antigénkötő hely álcázási technikája két általános lépésből áll. Először a kérdéses antitest-molekula variábilis doménjeinek vázrégióit összehasonlítjuk a humán variábilis domének fenti forrásokból származó, megfelelő FR-szekvenciáival, majd a legnagyobb homológiát mutató humán variábilis régiókat aminosavról aminosavra összehasonlítjuk a megfelelő egéredetű aminosavakkal. Az egéredetű FR-régió azon aminosavait, amelyek nem azonosak a humán FR-régióéval, jól ismert rekombináns módszerekkel a humán FR-régió megfelelő aminosavaival helyettesítjük. Az aminosav-váltást csak a legalább részlegesen szabad (oldószer számára hozzáférhető) aminosavak esetében hajtjuk végre, és a variábilis régió doménjeinek harmadlagos szerkezetét potenciálisan befolyásoló aminosavak (pl. prolin, glicin és a töltéssel bíró aminosavak) helyettesítését nagy gondossággal végezzük.

Ezzel a módszerrel a kapott "álcázott" egéredetű antigénkötő helyek úgy vannak megtervezve, hogy megmaradjanak az egéredetű CDR-aminosavak, a CDR-régiókkal lényegében szomszédos aminosavak, az oldószer számára nem hozzáférhető (lefedett vagy nagyobb részt lefedett) aminosavak, a nehéz és könnyű láncok doménjei közötti nem kovalens (pl. elektrosztatikus és hidrofób) kölcsönhatásokban vélhetően résztvevő aminosavak, és a vázrégiók konzervált strukturális régióinak aminosavai, melyek befolyásolják a CDR-hurkok "kanonikus" harmadlagos szerkezetét. Ezeket a tervezési kritériumokat olyan rekombináns nukleotidszekvenciák létrehozására alkalmazzuk, amelyekben egy egéredetű antigénkötő hely nehéz és könnyű lánc komplementaritást meghatározó régiói humán megjelenésű vázrégióval vannak kombinálva, és amelyek - az egéredetű antitest-molekula antigénspecifitásával bíró rekombináns humán antitestek termeltetése érdekében - emlőeredetű sejtek transzfektálására alkalmazhatók.

A találmány egy másik megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti monoklonális antitesteket egy vagy több terápiás hatóanyaghoz kapcsolhatjuk. Az e célra alkalmas hatóanyagok közé radionuklidok, differenciációt indukáló hatóanyagok, drogok, toxinok és ezek származékai tartoznak. Az előnyös radionuklidok példái a következők: ⁹⁰Y, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹¹At és ²¹²Bi; az előnyösen alkalmazható drogok közé tartozik a methotrexát, a pirimidin- és purinanalógok; a differenciációt indukáló hatóanyagok előnyös példái a forbolészterek és a vajsav; és a toxinok előnyös példáiként említhető a ricin, abrin,

diftériatoxin, koleratoxin, gelonin, *Pseudomonas* exotoxin, *Shigella* toxin és az alkörmös-eredetű antivirális protein.

A terápiás hatóanyagok a megfelelő monoklonális antitesthez közvetlenül vagy közvetve (pl. kapcsolócsoporton keresztül) kapcsolhatók (pl. kovalens kötéssel). Egy hatóanyag és egy antitest közötti közvetlen reakció akkor lehetséges, ha mindkettő tartalmaz egymással reagálóképes szubsztituenset. Például, az egyik molekulán lévő nukleofil csoport (pl. amino- vagy szulfhidrilcsoport) reakcióba léphet a másik molekulán elhelyezkedő karboniltartalmú csoporttal (pl. anhidriddel vagy savhalogeniddel) vagy jó távozócsoportot (pl. halogenidet) tartalmazó alkilcsoporttal.

Más módon, bizonyos esetekben előnyös lehet a terápiás hatóanyagot és az antitestet kapcsolócsoporton keresztül összekapcsolni. A kapcsolócsoport az antitest és a hatóanyag között - a kötési képességet csökkentő kölcsönhatások kiküszöbölése érdekében - távtartóként funkcionálhat. A kapcsolócsoport alkalmas lehet a hatóanyagon vagy az antitestben lévő szubsztituens kémiai reaktivitásának növelésére, és ezáltal a kapcsolási hatékonyság fokozására is. A kémiai reaktivitás növelése lehetővé teszi olyan hatóanyagok (vagy hatóanyagokon lévő funkciós csoportok) felhasználását, amelyek alkalmazása egyébként nem volna lehetséges.

Szakember számára kézenfekvő, hogy kapcsolócsoporthoz számos különböző difunkciós vagy polifunkciós reagens (homo- és heterofunkciós egyaránt) alkalmazható [ld. pl. a Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA) katalógusában leírtakat. A kapcsolás, például, aminocsoporton, karboxilcsoporton, szulfhidrilcsoporton vagy oxidált szénhidrát-gyökökön keresztül valósítható meg. Az ilyen módszerek leírását illetően ld. pl. a 4 671 958 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást (Rodwell és mtsai.).

Ha egy terápiás hatóanyag a találmány szerinti immunkonjugátumok antitest-komponensétől elválasztva jobb hatású, előnyös lehet olyan kapcsolócsoporthoz alkalmazni, amely a sejtbe történő internalizáció során (vagy azt követően) hasítható. Számos ilyen célra alkalmas hasítható kapcsolócsoporthoz ismeretes. A hatóanyag ilyen kapcsolócsoporthoz történő intracelluláris lehasításának mechanizmusai a következők: diszulfidkötés redukálása (ld. pl. a 4 489 710 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást); fénybomlékony kötés besugárzása (ld. pl. a 4 625 014 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást); derivatizált aminosav-oldalláncok hidrolízise (ld. pl. a 4 638 045 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást); szérum komplement-közvetítette hidrolízis (ld. pl. a 4 671 958 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást); és savkatalizálta hidrolízis (ld. pl. a 4 569 789 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást).

Bizonyos esetekben kívánatos lehet egy antitesthez egynél több hatóanyagot kapcsolni. A találmány egyik megvalósítási módja értelmében egyetlen antitest-molekulához egy hatóanyag több molekuláját kapcsoljuk. Egy másik megvalósítási mód szerint egyetlen antitesthez egynél több típusú hatóanyagot kapcsolhatunk. A konkrét megvalósítási módoktól függetlenül, az egynél több hatóanyagot tartalmazó immunkonjugátumok többféle módszerrel is előállíthatók. Például, a több hatóanyagot közvetlenül kapcsolhatjuk az antitest-molekulához, vagy olyan kapcsolócsoporthoz alkalmazhatunk, amely több kapcsolási helyet tartalmaz. Más módon, hordozót alkalmazhatunk.

A hatóanyagokat többféle módon (pl. közvetlen kovalens kötással vagy kapcsolócsoporthoz keresztül) kapcsolhatjuk a hordozóhoz. Az alkalmas hordozók közé proteinek (pl. albuminok, ld. pl. a 4 507 234 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást), peptidek és poliszacharidok (pl. aminodextrán, ld. pl. a 4 699 784 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást) tartoznak. A hordozó a hatóanyagot nem kovalens kötással vagy tokba zárás révén is tartalmazhatja (pl. liposzómán belül, ld. a 4 429 008 és 4 873 088 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat). A radioaktív hatóanyagokra specifikus hordozók közé tartoznak a radiohalogénezett kisméretű molekulák és kelátképző vegyületek. Például, a 4 735 792 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban radiohalogénezett kisméretű molekulákat és szintézisüket tárják fel. A radionuklid-kelátok olyan kelátképző vegyületekből állíthatók elő, amelyek a fém (vagy fém-oxid) radionuklid megkötéséhez donoratomként nitrogén- és kénatomokat tartalmaznak. A jellemző kelátképző vegyületeket és szintézisüket, például, a 4 673 562 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban tárták fel.

T-sejtek

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

A T-sejtek polipeptiddel, polipeptidet kódoló polinukleotid-szekvenciával és/vagy ilyen polipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejttel stimulálhatók. A stimulációt az adott polipeptidre specifikus T-sejtek kialakulásának megfelelő feltételek mellett és ideig végezzük. A találmány szerinti tumorpoliipeptidet vagy az azt kódoló polinukleotidot - a specifikus T-sejtek létrehozása céljából - előnyösen hordozóban (pl. mikrogömbökben) helyezzük el.

A T-sejtek akkor mondhatók egy találmány szerinti polipeptidre specifikusnak, ha a T-sejtek a polipeptiddel bevont (vagy a polipeptidet kódoló gént expresszáló) célsejtek jelenlétében specifikusan proliferálnak, citokineket szekretálnak vagy elpusztítják e célsejteket. A T-sejt-specifitás standard technikák alkalmazásával értékelhető. Például, krómfelszabadulási tesztben vagy proliferációs tesztben a lízis és/vagy proliferáció - negatív kontrollhoz viszonyítva - kétszeresnél nagyobb mértékű fokozásának megfelelő stimulációs index T-sejt-specifitást jelez. Az ilyen tesztek, például, Chen és mtsai. [Cancer Res. 54, 1065 (1994)] leírása szerint hajthatók végre. Más módon, a T-sejtek proliferációjának kimutatására számos ismert technika alkalmazható. Például, a T-sejt-proliferációt a megnövekedett mértékű DNS-szintézis mérésével detektálhatjuk (pl. T-sejtek tenyészetét impulzusszerűen 3H-timidinnel jelöljük, majd mérjük a DNS-be beépült 3H-timidin mennyiségét. Egy tumorpoliipeptiddel (100 ng/ml és 100 µg/ml közötti, előnyösen 200 ng/ml és 25 µg/ml közötti koncentrációban) 3-7 napig végzett érintkeztetés a T-sejt-proliferációt általában legalább kétszeresére növeli. Hasonló feltételekkel végzett 2-3 órás érintkeztetés - standard citokin-teszttel végzett meghatározás szerint, amelyben a citokin-felszabadulás (pl. TNF- vagy IFN-γ-felszabadulás) kétszeres mértékű fokozódása T-sejt-aktiválásra utal [ld. Coligan és mtsai.: "Current Protocols in Immunology", 1. kötet, Wiley Interscience, Greene (1998)] a T-sejtek aktiválását eredményezi. A tumorpoliipeptiddel, -polinukleotiddal vagy tumorpoliipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejttel végzett érintkeztetés hatására aktiválódott T-sejtek CD4+-ak és/vagy CD8+-ak lehetnek. A tumorpoliipeptidre specifikus T-sejtek szokványos módszerekkel szaporíthatók. A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a T-sejteket a páciensből, vele rokon donorból vagy rokonságban nem álló donorból gyűjtjük, és stimulációt és szaporítást követően adjuk be a páciensnek.

Terápiás célokra a tumorpoliipeptid, tumorpolinukleotid vagy antigénprezentáló sejt hatására proliferálódó CD4+ vagy CD8+ T-sejtek in vitro vagy in vivo szaporíthatók. Az ilyen T-sejtek in vitro szaporítását számos különféle módon végezhetjük. Például, a T-sejteket ismételtén tumorpoliipeptiddel - vagy annak immunogén részletének megfelelő rövid peptiddel - érintkeztethetjük (T-sejt növekedési faktorok, pl. interleukin-2 és/vagy a tumorpoliipeptidet

termelő stimulátor sejtek hozzáadásával vagy anélkül). Más módon, a tumorpolipeptid jelenlétében proliferálódó egy vagy több T-sejteket klónozással szaporíthatjuk. A sejtek klónozási technikái szakember számára jól ismertek (pl. limitáló hígítás).

Gyógyászati készítmények

5 A találmány további megvalósítási módjai értelmében olyan készítményeket tárunk, amelyek gyógyászati szempontból elfogadható hordozóban találmány szerinti polinukleotidot, polipeptidet, T-sejt-készítményt és/vagy antitestet tartalmaz, és amely - önmagában vagy egy vagy több egyéb készítménnyel együtt - sejtbe vagy állatba juttatható be.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A találmány bizonyos megvalósítási módjai értelmében a találmány szerinti polinukleotidot a célsejt genomjába integrálhatjuk; ez történhet homológ rekombinációval, adott helyre és orientációban (génhelyettesítés), illetve véletlenszerű, nem specifikus helyre (génkiegészítés). A találmány további megvalósítási módjai szerint a polinukleotidot a sejtben különálló episzomális DNS-szakaszként stabilan fenntarthatjuk a sejtben. Az ilyen polinukleotid-szakaszok vagy "episzómák" olyan szekvenciákat kódolnak, amelyek a gazdasejt sejtciklusától függetlenül - vagy azzal szinkronizált módon - lehetővé teszik a szekvencia fennmaradását és replikációját. A konstrukció sejtbe történő bejuttatásának módja és az, hogy a polinukleotid a sejt mely részében marad fenn, az alkalmazott expressziós konstrukció típusától függ.

sától függ.

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

A találmány egy következő megvalósítási módja szerint a találmány szerinti készítményt részecskebombázási technikával juttathatjuk be a sejtekbe. Az egyik jellemző példa értelmében gázzal hajtott részecskegyorsítást alkalmazhatunk, például, a Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, Egyesült Királyság) és a Powderject Vaccines, Inc. (Madison, WI, USA) által gyártott készülékek felhasználásával (néhány példát illetően ld. az 5 846 796, 6 010 478, 5 865 796 és 5 584 807 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat és a 0 500 799 számú európai szabadalmi leírást). Ez a megoldás tű alkalmazása nélküli bejuttatási módszert tesz lehetővé, melynek során kézzel tartott készülék által létrehozott héliumgáz-árammal mikroszkópikus szemcsékből (pl. polinukleotid- vagy polipeptid-szemcsékből) álló száraz port nagy sebességre gyorsítunk fel, ami a szemcséket a célszövetbe juttatja.

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

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint a találmány szerinti gyógyászati készítmények - a találmány szerinti immunogén polinukleotidon, polipeptiden, antitesten, T-sejt-készítményen és/vagy antigénprezentáló sejt készítményen kívül - egy vagy több immunstimulátort is tartalmaznak. Az "immunstimulátor" kifejezésen exogén antigénre adott (antitestes és/vagy sejtközvetítette) immunreakciót elősegítő vagy lehetővé tevő anyagot értünk. Az immunstimulátorok egyik előnyös típusa az adjuváns. Számos adjuváns tartalmaz olyan anyagot, amelynek feladata, hogy megvédje az antigént a gyors lebomlástól (pl. alumínium-hidroxid vagy ásványi olajok), illetve, hogy stimulálja az immunreakciókat (pl. lipid-A, Bordatella pertussis vagy Mycobacterium tuberculosis proteinjei). Bizonyos adjuvánsok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők, mint pl. a Freund-féle komplett és inkomplett adjuváns (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA); Merck Adjuvant-65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ, USA); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA, USA); alumínium-

sók, pl. alumínium-hidroxid gél (alum) vagy alumínium-foszfát; kalcium-, vas- és cinksók; acilezett tirozin oldhatatlan szuszpenziója; acilezett cukrok; kationos vagy anionos módon derivatizált poliszacharidok; polifoszfazének; biológiailag lebontható mikrogömbök; monofoszforil-lipid-A és quil-A. Adjuvánsként alkalmazhatók citokinek, pl. GM-CSF, interleukin-2, IL-7, IL-12 és egyéb hasonló növekedési hormonok is.

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

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

Más módon, a szaponinok olyan vakcinahordozókkal kombinálhatók, amelyek kitozánból vagy egyéb polikationos polimerekből, polilaktid és polilaktid-ko-glikolid szemcséből, poli-N-acetil-glükózamin-alapú polimerből, poliszacharidokból vagy kémiai módon

dosított poliszacharidokból álló szemcsékből, liposzómákból és lipidalapú szemcsékből, glicerin-monoészter szemcsékből és hasonlókból állnak. A szaponinok koleszterin jelenlétében is készítménybe foglalhatók, ami szemcsés struktúrát eredményez (pl. liposzómák és ISCOM-ok). Ezen túlmenően, a szaponinok készítményei polioxietilén-éterrel vagy -észterrel is előállíthatók, akár oldat vagy szuszpenzió, akár szemcsés alakban (pl. kevéslamellás liposzóma vagy ISCOM alakjában). A szaponinok a viszkozitás fokozása céljából olyan segédanyagokkal kombinálhatók, mint pl. a Carbopol®, illetve (segédanyagként pl. laktóz alkalmazásával) száraz porként is előállíthatók.

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

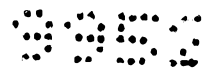
Egy további, javított adjuvánsrendszer CpG-tartalmú oligonukleotid és szaponinszármazék kombinációját tartalmazza, pl. CpG és QS21 kombinációját (ld. WO 00/09159 számú nemzetközi közzétételi irat). A készítmény előnyösen tartalmaz olaj a vízben emulziót és tokoferolt is.

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

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



ahol "n" értéke: 1-től 50-ig terjedő egész szám; "A" jelentése: kémiai kötés vagy -C(O)- cso-



port; "R" jelentése: 1-50 szénatomos alkilcsoport vagy fenil-(C1-50-alkil)csoport.

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

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

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

A találmány bizonyos előnyös megvalósítási módjai értelmében antigénprezentáló sejt-ként dendrites sejteket vagy azok összejtjeit alkalmazzuk. A dendrites sejtek igen hatékony antigénprezentáló sejtek [ld. Banchereau és Steinman: Nature 392, 245 (1998)], és profilaktikus vagy terápiás tumorellenes immunitás kiváltására hatékony fiziológiai adjuvánssal bizonyultak [ld. Timerman és Levy: Ann. Rev. Med. 50, 507 (1999)]. A dendrites sejtek általában jellegzetes alakjuk alapján [in situ csillag alakúak, in vitro látható citoplazmikus nyúlványok-

kal (dendritekkel)], antigéneket nagy hatékonysággal felvevő, feldolgozó és prezentáló képességük alapján, illetve natív T-sejt-reakciókat aktiváló képességük alapján azonosíthatók. A dendrites sejtek, természetesen, úgy módosíthatók, hogy olyan specifikus sejtfelületi recepto-
 5 rokat vagy ligandumokat expresszáljanak, amelyek normális esetben in vivo vagy ex vivo nem találhatók meg rajtuk. Az ilyen módosított dendrites sejtek a találmány tárgyhöz tartoznak. A vakcinában - a dendrites sejtek alternatívájaként - a dendrites sejtek szekretált antigénnel töltött vezikulái (ún. exoszómák) is alkalmazhatók [ld. Zitvogel és mtsai.: Nature Med. 4, 594 (1998)].

A dendrites sejtek és őssejtjeik perifériás vérből, csontvelőből, tumorba infiltrálódó
 10 sejtekből, tumorkörnyéki szövetekbe infiltrálódó sejtekből, nyirokcsomókból, lépéből, bőrből, köldökzsinór-vérből vagy bármely alkalmas szövetből vagy testfolyadékból izolálhatók. Például, a dendrites sejtek - perifériás vérből gyűjtött monociták tenyésztésihez citokinek (pl. GM-CSF, IL-4, IL-13 és/vagy $\text{TNF}\alpha$) kombinációjának hozzáadásával ex vivo differenciálthatók. Más módon, a perifériás vérből, köldökzsinór-vérből vagy csontvelőből gyűjtött CD34-
 15 pozitív sejtek - tenyésztő tápközegükhöz GM-CSF, IL-3, $\text{TNF}\alpha$, CD40-ligandum, LPS, flt3 -ligandum és/vagy egyéb (a dendrites sejtek differenciálódását, érését és proliferációját indukáló) vegyület(ek) kombinációinak hozzáadásával - differenciálhatók dendrites sejtekké.

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

Az antigénprezentáló sejtek általában egy találmány szerinti polinukleotiddal (vagy részletével vagy egyéb változatával) oly módon transzfektálhatók, hogy a kódolt polipeptid (vagy immunogén részlete) a sejtek felületén expresszálódjon. Az ilyen transzfekció ex vivo
 30 hajtható végre, majd a transzfektált sejteket tartalmazó gyógyászati készítményt, az itt ismertetett módon, terápiás célokra alkalmazhatjuk. Más lehetőség szerint, a páciensnek - dendrites sejtet vagy egyéb antigénprezentáló sejtet megcélzó - génbejuttató hordozót adhatunk be, miáltal a transzfekció in vivo játszódik le. A dendrites sejtek in vivo és ex vivo transzfekcióját a

szakember számára jól ismert eljárások bármelyikével végrehajthatjuk, így például, a WO 97/24447 számú nemzetközi közzétételi iratban leírt módszerekkel vagy a Mahvi és mtsai. [Immunology and Cell Biology 75, 456 (1997)] által leírt génágyú-technikával. A dendrites sejtek antigénnel történő feltöltése érdekében a sejteket (vagy összejtjeiket) a tumorpholipeptid-
5 del, DNS-sel (csupaszon vagy plazmidvektorba inszertálva), RNS-sel - vagy antigént expresszáló rekombináns baktériummal vagy vírussal (pl. vaccinia vírussal, baromfihimlő vírussal, adenovírussal vagy lentivírussal) - inkubáljuk. A feltöltést megelőzően a polipeptidet kovalens kötással olyan immunológiai partnerhez (pl. hordozómolekulához) konjugáljuk, amely T-sejt-segítséget biztosít. Más módon, a dendrites sejtet - a polipeptid jelenlétében vagy
10 attól elkülönítve - konjugátlan immunológiai partnerrel impulzuskezeljük.

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

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

A találmány egy másik jellemző megvalósítási módja szerint a találmány szerinti készítmények hordozóiként biológiaiilag lebontható mikrogömböket (pl. polilaktát-poliglikolat gömböket) alkalmazunk. Az e célra alkalmas, biológiaiilag lebontható mikrogömböket, példá-

ul, a 4 897 268, 5 075 109, 5 928 647, 5 811 128, 5 820 883, 5 853 763, 5 814 344, 5 407 609 és 5 942 252 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban tárták fel. Számos esetben hasznosak a módosított hepatitis-B core-protein rendszerek (ld. pl. a WO 99/40934 nemzetközi közzétételi iratot, valamint az abban felsorolt hivatkozásokat. Egy másik jellemző hordozó/célbajuttató rendszerben szemcsés proteinkomplexeket tartalmazó hordozót alkalmaznak (ld. pl. az 5 928 647 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást), melyek a gazdában MHC I. korlátozott citotoxikus T-limfocita reakciók indukálására képesek.

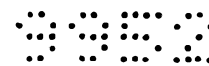
A találmány szerinti gyógyászati készítmények gyakran további komponenseket is tartalmazhatnak, így pl. egy vagy több puffert (pl. semlegesen pufferelt sóoldatot vagy foszfátpufferelt sóoldatot), szénhidrátokat (pl. glükózt, mannózt, szacharózt vagy dextránokat), mannitolt, proteineket, polipeptideket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

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

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

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

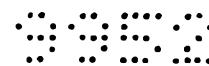
Az aktív vegyületek segédanyagokkal elegyítve lenyelhető tabletták, bukkális tabletták, pasztillák, kapszulák, elixírek, szuszpenziók, szirupok, ostyák, stb. alakjában foglalhatók



készítménybe [ld. pl. Mathiowitz és mtsai.: Nature 386, 410 (1997); Hwang és mtsai.: Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 15, 243 (1998); valamint az 5 641 515, 5 580 579 és 5 792 451 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat]. A tabletták, pasztillák, pirulák, kapszulák és hasonló további komponenseket is tartalmazhatnak, így pl. kötőanyagokat (pl. tragantmég-
5 ga, akácmégga, kukoricakeményítő vagy zselatin), segédanyagokat (pl. dikalcium-foszfát), szétesést elősegítő anyagot (pl. kukoricakeményítő, burgonyakeményítő, algin-sav és hason-
lók), lubrikánst (pl. magnézium-sztearát), édesítőt, pl. szacharózt, laktózt vagy szaccharint, valamint ízanyagokat (pl. mentaolaj, gaulteria-olaj vagy cseresznyearoma). Ha az egységdó-
zis-készítmény kapszula, a fentebb felsorolt anyagokon kívül folyékony hordozót is tartal-
10 mazhat. Bevonatként vagy az egységdózis fizikai alakjának egyéb módosítása érdekében to-
vábbi anyagok is alkalmazhatók. Például, a tabletták, pirulák vagy kapszulák sellakkal, cukor-
ral (vagy a kötő kombinációjával) vonhatók be. Természetesen, az egységdózis-alakok előál-
lítására alkalmazott anyagoknak gyógyászati szempontból tisztának kell lenniük, és az alkal-
mazott mennyiségekben lényegében nem lehetnek toxikusak. Ezen túlmenően, az aktív ve-
15 gyületek tartós hatóanyag-felszabadulást biztosító készítménybe is foglalhatók.

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

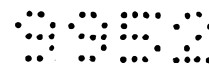
25 A találmány szerinti, orális adagolásra szánt készítmények, egy vagy több segéd-
anyag alkalmazásával, szájvíz, fogápoló krém, bukkális tableta, orális spray vagy
szublingvális készítmény formájában is előállíthatók. Más módon, az aktív összetevőt orálisan
adagolható oldatba (pl. nátrium-borátot, glicerint és kálium-hidrokén-karbonátot tartalmazó
oldatba) foglalhatjuk, fogápoló krémbe diszpergálhatjuk, vagy terápiásan hatásos mennyi-
30 ségben - vizet, kötőanyagokat, dörzsanyagokat, ízanyagokat, habosítókat és nedvesítőszeret
tartalmazó - készítményhez adhatjuk. Más módon, a készítményeket nyelv alá helyezhető
(vagy a szájüregben más módon felszívódó) tabletták vagy oldatok formájában is előállíthat-
juk.



A találmány szerinti gyógyászati készítményeket, bizonyos esetekben, kívánatos lehet parenterálisan, intravénásan, intramuszkulárisan vagy intraperitoneálisan adagolni. Az ilyen megoldások szakember számára jól ismertek (néhányuk leírását illetően ld. pl. az 5 543 158, 5 641 515 és 5 399 363 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat). A találmány bizonyos megvalósítási módjai értelmében az aktív vegyületet - szabad bázis vagy 5 gyógyászati szempontból elfogadható só alakjában - vizes oldatként állítjuk elő, amely alkalmas módon felületaktív anyaggal (pl. hidroxipropilcellulózzal) elegyíthető. Glicerinben, folyékony polietilén-glikolokban és elegyeikben, valamint olajokban diszperziók is előállíthatók. Szokványos tárolási és alkalmazási feltételek mellett az ilyen készítmények általában tartósítószereket is tartalmaznak, melyek megakadályozzák a mikroorganizmusok elszaporodását. 10

Az injektálható gyógyászati készítmények jellemző példái a steril vizes oldatok vagy diszperziók (ld. pl. az 5 466 468 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást). Az injektálható készítménynek minden esetben sterilnek és - a könnyű fecskendezhetőséghez szükséges mértékben - folyékornak, továbbá a gyártási és tárolási feltételek mellett stabilnak kell lennie. A mikroorganizmusok (pl. baktériumok és gombák) károsító hatásának megelőzése céljából az ilyen készítményeket is tartósítani kell. Hordozóként oldószert vagy diszpergálóközeget, így pl. vizet, etanolt, polialkoholt (pl. glicerint, propilén-glikolt, folyékony polietilén-glikolt és hasonlókat), valamint ezek keverékeit és/vagy növényi olajokat alkalmazhatunk. A megfelelő fluiditás, például, nedvesítőanyag (pl. lecitin) alkalmazásával, diszperziók esetében a kívánt szemcseméret biztosításával, és/vagy felületaktív anyagok alkalmazásával érhető el. A mikroorganizmusok hatása különböző antibakteriális és gombaellenes hatóanyagok - például, parabének, klórbutanol, fenol, szorbinsav, thimerosal és hasonlóak - alkalmazásával gátolható. Számos esetben előnyös az izotonizáló anyagok (pl. cukrok vagy nátrium-klorid) alkalmazása is. Az injektálható készítmények hosszú időtartamú felszívódása abszorpciót késleltető hatóanyag-készítmények (pl. alumínium-monosztearát és zselatin) alkalmazásával biztosítható. 20 25

A találmány egyik megvalósítási módja szerint, a parenterális adagolásra szánt vizes oldatot, szükség esetén, megfelelően puffereljük, és először a folyékony diluendumot izotonizáljuk megfelelő mennyiségű sóoldattal vagy glükózzal. Az ilyen vizes oldatok különösen hasznosak az intravénás, intramuszkuláris, szubkután és intraperitoneális adagolási módokhoz. Az e célra alkalmas, steril, vizes közegek a leírás alapján szakember számára jól ismertek. Például, egy dózist 1 ml izotóniás NaCl-oldatban oldunk, majd a kapott oldatot 1000 ml hipodermoclysis folyadékhoz adjuk vagy az előre kiválasztott infúziós helyre injektáljuk (ld. pl. "Remingtons' s Pharmaceutical Sciences", 15. kiadás, 1035-1038. és 1570-1580. oldalak). 30

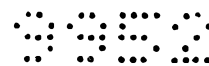


A dozírozás a kezelni kívánt páciens állapotától függően változó lehet. Emberek kezelése esetén a készítményeknek meg kell felelniük az FDA Office of Biologics Standards által előírt sterilitási, pirogenitási és általános biztonsági és tisztasági követelményeknek.

5 A találmány egy további megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti készítményeket neutrális vagy só alakban állíthatjuk elő. A gyógyászati szempontból elfogadható sók jellemző példái közé tartoznak a savaddíciós sók (melyek a protein szabad aminoszortjaival kerülnek kialakításra), és amelyek szervesen savak (pl. sósav vagy foszforsav) vagy szerves savak (pl. ecetsav, oxálsav, borkősav, mandulasav, stb.) hozzáadásával állíthatók elő. A gyógyászati szempontból elfogadható sók közé tartoznak a protein szabad karboxilcsoport-
10 jaival létrehozható bázisaddíciós sók is, amelyek szervesen bázisokból (pl. nátrium-, kálium-, ammónium-, kalcium- vagy vas-hidroxidból) vagy szerves bázisokból (pl. izopropilaminból, trimetilaminből, hisztidinből, prokainból és hasonlókból) származtathatók. Az oldatokat - elkészítésük után - a dózisalagnak megfelelő és terápiás szempontból hatásos mennyiségben adagoljuk.

15 A hordozók - a fentiek mellett - tartalmazhatnak különféle oldószereket, diszpergáló közegeket, vehiculumokat, nedvesítőszereket, diluendumokat, antibakteriális és gombaellenes hatóanyagokat, izotonizáló és abszorpciót késleltető hatóanyagokat, puffereket, vivőoldatokat, szuszpenziókat, kolloidokat és hasonlókat. Az ilyen közegek és hatóanyagok alkalmazása szakember számára jól ismert és ezek találmány szerinti készítményekben történő alkalmazása
20 - hacsak nem összeférhetetlen az aktív komponenssel - a találmány oltalmi körébe tartozik. A "gyógyászati szempontból elfogadható" kifejezés olyan molekuláris entitásokra és készítményekre vonatkozik, amelyek embernek beadva nem okoznak allergiás vagy egyéb, nem kívánatos reakciókat.

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



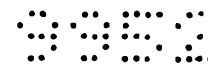
A találmány bizonyos megvalósítási módjaiban a találmány szerinti készítmények megfelelő gazdasejtekbe vagy gazdaszervezetekbe történő bejuttatására liposzómákat, nanokapszulákat, mikroszemcséket, lipidszemcséket, vezikulákat és hasonlókat alkalmazunk. A találmány szerinti készítmények lipidszemcsébe,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

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

A liposzómákat számos olyan sejttípus esetében alkalmazták sikeresen, amelyeket más módszerekkel bonyolult transzfektálni, ideértve a T-sejt-szuszpenziókat, elsődleges hepatocita-tenyészeteket és a PC-12-sejteket [Renneisen és mtsai.: J. Biol. Chem. 265, 16377 (1990); Müller és mtsai.: DNA Cell Biol. 9, 221 (1990)]. Ezen túlmenően, a liposzómák esetében nincsenek DNS-hosszúságra vonatkozó megszorítások, mint a vírusalapú célbajuttató rendszereknél. A liposzómákat hatékonyan alkalmazták gének, különféle drogon, radioterapiás hatóanyagok, enzimek, vírusok, transzkripciósfaktorok, alloszterikus effektorok és hasonlók tenyésztett sejtvonalakba és állatokba történő bejuttatására. Ezen túlmenően, a liposzómák alkalmazása esetén a szisztémás bejuttatást követően nem lépnek fel autoimmun reakciók és nem kívánatos toxicitási mellékhatások.

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

Más módon, a találmány egyik megvalósítási módja értelmében, a találmány szerinti készítmények gyógyászati szempontból elfogadható nanokapszulás alakjait tárjuk fel. A nanokapszulákba a vegyületek általában stabil és reprodukálható módon vannak befoglalva [ld. pl. Quintanar-Guerrero és mtsai.: Drug Dev. Ind. Pharm. 24, 1113 (1998)]. Az intracelluláris polimeres túltöltöttség mellékhatásainak elkerülése érdekében az ilyen ultrafinom (kb. 0,1 μm -es) szemcsék in vivo lebontható polimerek alkalmazásával tervezhetők. A szemcsék előállítására, például, a Couvreur és mtsai. [Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 5, 1 (1998)],



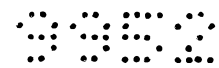
zur Muhlen és mtsai. [Eur. J. Pharm. Biopharm. 45, 149 (1998)] és Zambaux és mtsai. [J. Controlled Release 50, 31 (1998)] által leírt, és az 5 145 684 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban feltárt eljárások alkalmazhatók.

Rákterápiás eljárások

5 A találmány további szempontjainak megfelelően, a találmány szerinti gyógyászati készítményeket rák kezelésére, elsősorban emlőrákrák immunterápiájára alkalmazhatjuk. Az ilyen eljárások során a találmány szerinti gyógyászati készítményeket egy páciensnek, jellemzően melegvérű állatnak, előnyösen embernek adagoljuk. A páciens rákos vagy ráktól még nem szenvedő egyaránt lehet. Ilyenformán, a találmány szerinti gyógyászati készítmények rák
10 kialakulásának gátlására és ráktól szenvedő páciens kezelésére egyaránt alkalmazható. A gyógyászati készítményeket és vakcinákat az elsődleges tumorok sebészeti eltávolítását és/vagy radioterápiás vagy hagyományos kemoterápiás kezelést megelőzően vagy azt követően egyaránt adagolhatjuk. Ahogy fentebb említettük, a gyógyászati készítmények adagolását bármely alkalmas módon, így pl. intravénásan, intraperitoneálisan, intramuszkulárisan, szubkután,
15 intranazálisan, intradermálisan, análisan, vaginálisan, topikusan és orálisan végezhetjük.

A találmány bizonyos megvalósítási módjai értelmében az immunterápiát aktív immunterápiaként végezzük, ami a gazdaszervezet immunrendszerének - immunreakciót módosító hatóanyagok (pl. a találmány szerinti polipeptidek és polinukleotidok) adagolásával végrehajtott - in vivo stimulálásán alapul, amelynek eredményeként az immunrendszer a tumorokkal lép reakcióba.
20

A találmány további megvalósítási módjai értelmében az immunterápiát passzív immunterápiaként végezzük, melynek során olyan hatóanyagokat juttatunk be a páciensbe, amelyek tumorellenes immunreaktivitással bírnak (pl. effektor-sejtek vagy antitestek), közvetlenül vagy közvetve tumorellenes hatásokat közvetítenek, és nem igénylik, hogy a gazdaszervezet immunrendszere ép legyen. Az effektor-sejtek példái közé tartoznak a fentebb leírt T-sejtek, T-limfociták (pl. CD8+ citotoxikus T-limfociták és tumorba infiltrálódó CD4+ T-helper limfociták), ölüsejtek (pl. természetes ölüsejtek és limfokin-aktiválta ölüsejtek), B-sejtek és antigénprezentáló sejtek (pl. dendrites sejtek és makrofágok), melyek találmány szerinti polipeptidet termelnek. A találmány szerinti polipeptidekre specifikus T-sejt-receptorok és
25 antitest-receptorok adoptív immunterápia céljából klónozzhatók, expresszáltathatók és egyéb vektorokba vagy effektor-sejtekbe juttathatók. A találmány szerinti polipeptidek - passzív immunterápia céljából - antitestek vagy anti-idiotípusos antitestek előállítására is felhasználhatók (ld. fentebb és a 4 918 164 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást).
30



Az effektor-sejtek adoptív immunterápiához szükséges mennyiségét in vitro sejtenyészéssel állíthatjuk elő. Az antigénspecifikus effektor-sejtek (in vivo antigénfelismerés megőrzése mellett) több milliós sejtszám eléréséig történő tenyésztésére alkalmas feltételek szakember számára jól ismertek. Az ilyen in vitro tenyésztési feltételek rendszerint magukban foglalják az antigénnel végzett szakaszos stimulációt (gyakran citokinek, pl. IL-2, és nem osztódó táplálósejtek jelenlétében). Ahogy fentebb említettük, a találmány szerinti immunreaktív polipeptidek az antigénspecifikus T-sejtek tenyészteteinek gyors gyarapítására - s ezáltal az immunterápiához kellő számú sejt létrehozására - alkalmazhatók. Közelebbről, antigénprezentáló sejteket (pl. dendrites sejteket, makrofágokat, monocitákat, fibroblasztokat és/vagy B-sejteket) impulzusszerűen az immunreaktív polipeptidekkel kezelhetünk vagy - szakember számára jól ismert, standard eljárások alkalmazásával - egy vagy több polinukleotiddal transzfektálhatunk. Például, az antigénprezentáló sejteket - rekombináns vírusban vagy más expressziós rendszerben az expresszió fokozására alkalmas promótert tartalmazó - polinukleotiddal transzfektálhatjuk. A terápiás célra tenyésztett effektor-sejteknek in vivo szaporodásképesnek és jó eloszlási képességűnek kell lenniük, és hosszú ideig életben kell maradniuk. Kísérletekkel kimutatták, hogy a tenyésztett effektor-sejtek IL-2-vel kiegészített antigénnel végzett, ismételt stimulációval in vivo szaporodásra és hosszú időtartamú életbenmaradásra indukálhatók [ld. pl. Cheever és mtsai.: Immunological Reviews 157, 177 (1997)].

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

A találmány szerinti gyógyászati készítmények adagolásának módja és gyakorisága, valamint dózisa egyénről egyénre változó, és standard technikák alkalmazásával könnyen meghatározható. A találmány szerinti gyógyászati készítmények és vakcinák általában injekcióval (pl. intrakután, intramuszkuláris, intravénás vagy szubkután injekcióval), intranazálisan (pl. belélegeztetéssel) vagy orálisan adagolhatók. Előnyösen 52 hét alatt 1-10 dózis adható. Előnyösen egy hónapos időközönként hat dózist adunk be, és utána időközönként emlékeztetőoltást adunk. Az egyes páciensek esetében más és más séma lehet alkalmas. A megfelelő dózis az adott vegyület azon mennyisége, amely a fentiek szerint adagolva képes tumorelles immunreakció kiváltására, amely legalább 10-50 %-kal nagyobb az alapszintnél

(vagyis a nem kezelt páciensek esetében megfigyelhető reakciónál). A kiváltott reakció a páciensben lévő tumorellenes antitestek mennyiségének mérésével vagy a páciens tumorsejtjeinek in vitro elpusztítására képes citolitikus effektor-sejtek vakcina-dependens létrehozásával ellenőrizhető. Az ilyen vakcinák képesek olyan immunreakció indukálására is, amely a vakcinált

5 páciensekben - a nem vakcinált betegekkel összehasonlítva - javított klinikai eredményhez (pl. gyakoribb enyhüléshez, részleges vagy teljes vagy hosszú idejű, tünetmentes túléléshez) vezető immunreakciót képes indukálni. Az egy vagy több találmány szerinti polipeptidet tartalmazó gyógyászati készítményekben és vakcinákban az egyes polipeptidek kb. 25 µg/testtömeg-kilogrammtól 5 mg/testtömeg-kilogrammig terjedő dózistartományban vannak jelen. A

10 dózismennyiség a páciens testtömegétől függően változik, de általában kb. 0,1-5 ml megfelelő.

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

15 általában összhangban van a javított klinikai eredménnyel. Az ilyen immunreakciók rendszerint standard proliferációs, citotoxicitási vagy citokin-tesztek alkalmazásával értékelhetők, melyeket a páciensből a kezelés előtt és után vett mintákkal végzünk.

Rákdetektálási és diagnosztizálási készítmények, eljárások és reagenskészletek

20 Egy páciensben a rákot egy vagy több emlőtumor-protein és/vagy ilyen proteint kódoló polinukleotid páciensből vett biológiai mintában (pl. vérben, vésavóban, köpetben, vizeletben és/vagy tumorbiopsziában) való jelenléte alapján detektáljuk. Más szóval, az ilyen

25 proteinek rák, pl. emlőrák jelenlétének vagy hiányának markereként alkalmazhatók. Ezenfelül, a szóban forgó proteinek egyéb rákbetegségek kimutatására is hasznosak lehetnek. A találmány szerinti kötőreagens általában lehetővé teszik a biológiai mintában lévő reagenshez kötődő antigén mennyiségének meghatározását. A láncindító-polinukleotidok és polinukleotid-próbák a tumorproteinek kódoló mRNS-ek mennyiségi meghatározására alkalmazhatók, ami szintén jelzi a rák jelenlétét, illetve hiányát. Általában a tumorszövetben az emlőtumor-szekvenciának legalább háromszor nagyobb mennyiségben kell jelen lennie, mint a normál

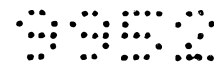
30 szövetben.

Egy kötőreagens mintában lévő polipeptid-markerek kimutatására történő alkalmazásának számos vizsgálati módszere ismeretes [ld. pl. Harlow és Lane: "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]. Egy rák jelenléte vagy hiánya

egy páciensben általában a következők szerint határozható meg: (a) a páciensből vett biológiai mintát kötőreagenssel érintkeztetjük; (b) a mintában kimutatjuk a polipeptid kötőreagenshez kötődött mennyiségét; és (c) a polipeptid mennyiségét egy előre megállapított küszöbértékkel hasonlítjuk össze.

5 A találmány egy előnyös megvalósítási módja értelmében a vizsgálati eljárás során szilárd hordozón immobilizált kötőreagenst alkalmazunk, melynek célja a polipeptid megkötése és a minta maradékából történő eltávolítása. A megkötött polipeptidet ezután riportercsoportot tartalmazó detektálóreagens alkalmazásával mutatjuk ki, amely specifikusan kötődik a kötőreagens/polipeptid komplexhez. Az ilyen detektálóreagens, például, olyan kötőreagenst tartalmazhat, amely specifikusan kötődik a polipeptidhez vagy egy antitesthez (vagy egyéb olyan reagenshez, amely specifikusan képes megkötni a kötőreagenst, mint pl. egy anti-immunglobulin, protein-G, protein-A vagy lektin). Más módon, kompetitív tesztet alkalmazhatunk, melynek során egy polipeptidet riportercsoporttal jelölünk, majd - a kötőreagens mintával végzett inkubálása után - hagyjuk az immobilizált kötőreagenshez kötődni. A minta
10 tartalmazhat, amely specifikusan kötődik a polipeptidhez vagy egy antitesthez (vagy egyéb olyan reagenshez, amely specifikusan képes megkötni a kötőreagenst, mint pl. egy anti-immunglobulin, protein-G, protein-A vagy lektin). Más módon, kompetitív tesztet alkalmazhatunk, melynek során egy polipeptidet riportercsoporttal jelölünk, majd - a kötőreagens mintával végzett inkubálása után - hagyjuk az immobilizált kötőreagenshez kötődni. A minta
15 immobilizált kötőreagensre vonatkozó reaktivitását az jelzi, hogy a minta mely komponense milyen mértékben gátolja a jelölt polipeptid kötőreagenshez történő kötődését. Az ilyen tesztekben alkalmazható polipeptidek közé tartoznak a teljes hosszúságú tumorproteinek és azok polipeptid-részletei, amelyhez a kötőreagens kötődni képes (ld. fentebb).

Szilárd hordozóként bármely olyan anyag alkalmazható, amelyhez a tumorprotein
20 hozzákapcsolható. Például, szilárd hordozóként mikrotiter-tálca üregét vagy nitrocellulóz vagy más anyagból készült membránt alkalmazhatunk. Más módon, hordozóként - üvegből, üvegszálalás műanyagból, latexből vagy műanyagból (pl. polisztirolból vagy polivinilkloridból) készült - golyó vagy korong is alkalmazható. Ezen túlmenően, a hordozó lehet mágneses szemcse vagy száloptikás érzékelő (ld. pl. az 5 359 681 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást) A kötőreagens szakember számára jól ismert - a szabadalmi és tudományos szakirodalomban részletesen leírt - technikák alkalmazásával immobilizálható a szilárd hordozón. Ahogy a leírásban használjuk, az "immobilizálás" kifejezés nem kovalens asszociációra (pl. adszorpció) és kovalens kötésre egyaránt vonatkozik (mely utóbbi a reagens és a hordozón lévő funkciós csoportok közötti közvetlen kötés vagy keresztkötő reagens közvetítésével
25 megvalósuló kötés egyaránt lehet). Előnyösen a mikrotiter-tálca üregéhez vagy egy membránhoz történő adszorpciós immobilizálást alkalmazzuk. Ilyen esetekben az adszorpciót úgy idézzük elő, hogy a kötőreagenst megfelelő pufferben, megfelelő ideig a szilárd hordozóval érintkeztetjük. Az érintkeztetés időtartama a hőmérséklettől függően változó, de általában kb. egy
30



órától kb. egy napig terjedhet. Egy kötőreagens megfelelő mennyiségének immobilizálása céljából egy műanyag (pl. polisztirol vagy polivinilklorid) mikrotiter-tálca üregét általában a kötőreagens kb. 10 ng-tól kb. 10 µg-ig, előnyösen kb. 100 ng-tól kb. 1 µg-ig terjedő mennyiséggel érintkeztetjük.

5 A kötőreagens szilárd hordozóhoz történő kovalens kapcsolásának megvalósítása céljából a hordozót először egy difunkciós reagenssel reagáltatjuk, amely a hordozóval és a kötőreagens funkciós csoportjával (pl. hidroxil- vagy aminocsoportjával) egyaránt képes reagálni. Például, a kötőreagenst benzokinon alkalmazásával kovalens kötéssel kapcsolhatjuk a megfelelő polimerbevonattal ellátott hordozókhoz vagy a hordozó aldehidcsoportját a kötő-
10 partner aminjával vagy aktív hidrogénjével kondenzálva létesíthetünk kovalens kötést [ld. pl. Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, A12-A13 (1991)].

 A találmány bizonyos megvalósítási módjai értelmében a vizsgálati eljárást két antitest alkalmazásával végzett "szendvics"-tesztként hajtjuk végre. Ennek elvégzéséhez először egy szilárd hordozón (rendszerint mikrotiter-tálca üregében) immobilizált antitestet érintkez-
15 tetünk a mintával, oly módon, hogy a mintában lévő polipeptidek hozzákötődhessenek az immobilizált antitesthez. A nem kötődött minta immobilizált polipeptid-antitest komplexekről történő eltávolítása után az üreghez - riportercsoportot tartalmazó - detektálóreagenst (előnyösen a polipeptid egy másik helyéhez kötődni képes második antitestet) adunk. Ezt követően - az alkalmazott riportercsoportnak megfelelő eljárás alkalmazásával - meghatározzuk a detek-
20 tálóreagens szilárd hordozón kötött állapotban maradt mennyiségét.

 Részletesebben; miután az antitestet a fentiek szerint immobilizáltuk a szilárd hordozón, a hordozó maradék proteinkötő helyeit - szakember számára jól ismert blokkolóreagenssel, pl. szarvasmarha-szérumalbuminnal vagy Tween-20TM-szal (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) blokkoljuk. Ezt követően az immobilizált antitestet a mintával inkubáljuk,
25 és a polipeptidet hagyjuk az antitesthez kötődni. A mintát az inkubálás előtt megfelelő hígítóanyaggal, pl. foszfátpufferelt sóoldattal (PBS) hígíthatjuk. A megfelelő érintkeztetési idő (vagyis az inkubációs idő) általában az az idő, amely elégséges egy emlőrákos betegből vett mintában lévő polipeptid jelenlétének kimutatásához. Az érintkeztetési idő előnyösen a kötött és nem kötött polipeptid közötti egyensúlynál megfigyelhető kötődési szint legalább kb. 95 %-
30 ának megfelelő kötődés eléréséhez szükséges idő. Az egyensúly eléréséhez szükséges idő az adott időtartam alatt bekövetkező kötődés mérésével könnyen meghatározható. Szobahőmérsékleten általában kb. 30 perces inkubálási idő elegendő.

A nem kötődött mintát a szilárd hordozó megfelelő pufferrel - pl. 0,1 % Tween-20TM-at tartalmazó foszfátpufferelt sóoldattal - végzett mosásával távolítjuk el, majd a szilárd hordozóhoz hozzáadhatjuk a riporter csoportot tartalmazó második antitestet. Az előnyös riporter csoportok közé tartoznak a fentebb megadottak.

5 Ezt követően a detektálóreagenst - a kötött polipeptid kimutatásához elegendő ideig - az immobilizált antitest-polipeptid komplexszel inkubáljuk. A megfelelő inkubálási idő az adott időtartam alatt bekövetkező kötődés mérésével határozható meg. A nem kötődött detektálóreagens eltávolítása után a detektálóreagenst a riporter csoport segítségével detektáljuk. A riporter csoport kimutatására az adott riporter csoport természetének megfelelő eljárást
10 alkalmazunk. Radioaktív csoportok esetén szcintillációs számlálás vagy autoradiográfiás eljárások alkalmasak. A festékek, lumineszcens csoportok és fluoreszcens csoportok detektálására spektroszkópiás módszerek alkalmazhatók. A biotin avidin alkalmazásával mutatható ki, amely egy eltérő riporter csoporthoz (rendszerint radioaktív vagy fluoreszcens csoporthoz vagy enzimhez) van kapcsolva. Az enzimatis riporter csoportok általában az enzim és szubsztátja
15 (meghatározott ideig tartó) érintkeztetésével, majd a reakciótermékek spektroszkópiás vagy egyéb analízisével detektálhatók.

Rák, pl. emlőrák, jelenlétének vagy hiányának kimutatása céljából a szilárd hordozóhoz kötött állapotban maradt riporter csoport által adott jelet általában egy előre meghatározott küszöbértéknek megfelelő jelhez viszonyítjuk. Az egyik előnyös megvalósítási mód szerint a
20 rák kimutatására alkalmas küszöbérték az az átlagos jel, amelyet akkor kapunk, ha az immobilizált antitestet ráktól nem szenvedő páciensekből származó mintákkal inkubáljuk. Általában azokat a mintákat tekintjük a vizsgált rákra pozitívnak, amelyek az előre meghatározott küszöbértéknél háromszoros szórásértéknek megfelelő jelet adnak. A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja értelmében a küszöbértéket "Receiver Operator" görbe al-
25 kalmazásával, Sackett és mtsai. ["Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine", Little Brown and Co., 106-107. old. (1985)] leírása szerint határozzuk meg. E megvalósítási mód szerint a küszöbértéket valós pozitív ráták (azaz érzékenység) és hamis pozitív ráták (100 %-os specifitás) párjainak - melyek megfelelnek a diagnosztikai teszteredmények minden egyes lehetséges küszöbértékének - görbéje alapján határozzuk meg. A grafi-
30 konon a bal felső sarokhoz legközelebb eső küszöbérték (vagyis a legnagyobb területet bezáró érték) a legpontosabb küszöbérték, és az e módszerrel meghatározott küszöbértéknél nagyobb jelet adó minta pozitívnak tekinthető. Más módon, a küszöbérték (a hamis pozitív ráta minimalizálása érdekében) a görbe mentén balra, a hamis negatív ráta minimalizálása érdekében

pedig jobbra tolható el. Általában az e módszerrel meghatározott küszöbértéknél nagyobb jelet adó mintát rák vonatkozásában pozitívnak tekintjük.

Egy másik, előzővel összefüggő megvalósítási mód szerint a tesztet átfolytatásos vagy szalagteszt formátumban végezzük, melynek során a kötőreagenst membránon (pl. nitrocellulóz-membránon) immobilizáljuk. Az átfolytatásos teszt során a mintában lévő polipeptidek - a minta membránon történő áthaladásakor - az immobilizált kötőreagenshez kötődnek. Ezt követően a membránon átfolytatunk egy második, jelölt kötőreagenst tartalmazó oldatot, mely második kötőreagens hozzákötődik a kötőreagens-polipeptid komplexhez. A megkötődött második kötőreagens kimutatását a fentebb leírtak szerint végezzük. A szalagteszt formátumban az immobilizált kötőreagenst tartalmazó membrán egyik végét a mintát tartalmazó oldatba merítjük. A minta a membránon vándorolva áthatol egy második kötőreagenst tartalmazó régió és az immobilizált kötőreagenst tartalmazó területre jut. A második kötőreagens immobilizált antitest területén mérhető koncentrációja jelzi a rák jelenlétét. Ezen a helyen a második kötőreagens koncentrációja általában valamilyen mintázatot (pl. vonalat) hoz létre, amely vizuálisan leolvasható. Az ilyen mintázat hiánya negatív eredményt jelent. A membránon immobilizált kötőreagens mennyiségét rendszerint úgy választjuk meg, hogy vizuálisan észlelhető mintázatot hozzon létre, ha a biológiai minta olyan mennyiségű polipeptidet tartalmaz, amely két antitestet szendvics-tesztben (ld. fentebb) pozitív jel indukálásához elégséges lenne. Az ilyen tesztekben előnyösen alkalmazható kötőreagens antitestek vagy azok antigénköti fragmensei. A membránon immobilizált antitest mennyisége előnyösen általában kb. 25 ng-tól kb. 1 µg-ig, még előnyösebben kb. 50 ng-tól kb. 500 ng-ig terjed. Az ilyen teszteket rendszerint nagyon kis mennyiségű biológiai mintával hajtjuk végre.

Természetesen számos egyéb teszteljárás létezik, melyek hasznosak a találmány szerinti tumorproteinekkal vagy kötőreagenssekkal történő alkalmazásra. A fentieket csupán szemléltetésnek szánjuk. Például, szakember számára kézenfekvő, hogy a fenti eljárások egyszerűen módosíthatók a tumorpolipeptidek mintában lévő antitestek (melyek képesek az ilyen polipeptidekhez kötődni) kimutatására történő alkalmazása céljából. Az ilyen tumorprotein-specifikus antitestek kimutathatósága rák jelenlétével állhat összefüggésben.

Emellett - vagy más módon -, rákos betegség kimutatását tumorproteinrel specifikusan reagáló T-sejtek biológiai mintában való jelenléte alapján is végezhetjük. Bizonyos eljárások során a páciensből izolált - CD4+ és/vagy CD8+ T-sejteket tartalmazó - biológiai mintát egy tumorpolipeptiddel (vagy ilyen tumorpolipeptidet kódoló polinukleotiddal) és/vagy az ilyen polipeptid legalább immunogén részletét expresszáló antigénprezentáló sejttel inkubá-

lunk, és kimutatjuk a T-sejtek specifikus aktiválásának jelenlétét vagy hiányát. Biológiai mintaként, többek között, izolált T-sejteket alkalmazhatunk. Például, a T-sejteket szokványos eljárásokkal (pl. perifériás vér limfocitáinak Ficoll/Hypaque sűrűséggradiens centrifugálásával) izolálhatjuk a páciensből. A T-sejteket in vitro 2-9 napig (rendszerint 4 napig) 37 °C-on
5 inkubáljuk a polipeptiddel (pl. 5-25 µg/ml koncentrációban). A T-sejt-minta egy másik alikvotját - kontrollként - tumorpolipeptid hiányában inkubálhatjuk. CD4+ T-sejtek esetében az aktiválást előnyösen a T-sejtek proliferációjának meghatározásával detektáljuk, míg CD8+ T-sejtek esetében az aktiválást előnyösen a citolitikus aktivitás értékelésével mutatjuk ki. A proliferáció és/vagy a citolitikus aktivitás - betegségtől mentes páciensekben megfigyelhető
10 értéknél - legalább 20 %-kal nagyobb szintje a vizsgált páciensben rák jelenlétére utal.

Ahogy fentebb említettük, rákos betegség jelenlétére tumorproteint kódoló mRNS biológiai mintában meghatározott koncentrációja alapján is következtethetünk. Például, egy biológiai mintából származó tumor-cDNS részletének amplifikálására - polimeráz-láncreakción (PCR) alapuló vizsgálati eljárásban legalább két láncindító oligonukleotidot alkalmaz-
15 hatunk, melyek legalább egyike specifikus a tumorproteint kódoló polinukleotiddal (azaz képes ahhoz hibridizálódni). Az amplifikált cDNS-t ezután jól ismert technikák (pl. gélelektroforézis) alkalmazásával elkülönítjük és detektáljuk. Hasonlóan, tumorproteint kódoló polinukleotid biológiai mintában való jelenlétének kimutatására, hibridizációs tesztben, tumorproteint kódoló polinukleotiddal specifikusan hibridizáló oligonukleotid-próbákat al-
20 kalmazhatunk.

Tesztelési feltételek mellett a hibridizáció elősegítése céljából a láncindító oligonukleotidoknak és próbáknak olyan nukleotidszekvenciát kell tartalmazniuk, amely egy találmány szerinti tumorproteint kódoló polinukleotid megfelelő (legalább 10 nukleotidos, előnyösen legalább 20 nukleotidos) részletével legalább kb. 60 %-ban, előnyösen legalább kb. 75 %-ban,
25 még előnyösebben legalább kb. 90 %-ban azonos. A láncindító oligonukleotidok és/vagy oligonukleotid-próbák a fentebb leírtak szerint, mérsékelt sztringens feltételek mellett találmány szerinti polipeptidet kódoló polinukleotidhoz képesek hibridizálni. A találmány szerinti diagnosztikai eljárásokban hasznosan alkalmazható láncindító oligonukleotidok és/vagy oligonukleotid-próbák legalább 10-40 nukleotid hosszúságúak. Az egyik előnyös megvalósítási mód szerint a láncindító oligonukleotidok egy találmány szerinti nukleotidszekvenciát tartalmazó DNS-molekula legalább 10, előnyösen legalább 15 szomszédos nukleotidját tartalmaz-
30 mazták. A PCR-alapú tesztek és a hibridizációs tesztek technikája szakember számára jól ismert [ld. pl. Mullis és mtsai.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51, 263 (1987); Erlich

(szerk.): "PCR Technology", Stockton Press, NY (1989)].

Az egyik előnyös tesztet reverz transzkriptázos polimeráz-láncreakció (RT-PCR) alkalmazásával végezzük, melynek során egy biológiai mintából (pl. biopszia szövetből) RNS-t vonunk ki, azt reverz transzkripcióval cDNS-molekulákká alakítjuk, és legalább egy specifikus lánccindító oligonukleotid alkalmazásával végzett PCR-amplifikációval cDNS-molekulát kapunk, amelyet, például, gélelektroforézissel különíthetünk el és tehetünk láthatóvá. Az RNS forrásaként a tesztelni kívánt páciensből, illetve ráktól nem szenvedő egyéntől vett biológiai mintákat alkalmazhatunk. Az amplifikációs reakciót a cDNS több - két nagyságrendet lefedő - hígításával végezzük. A teszteredményt általában akkor tekintjük pozitívnak, ha a tesztelt páciens mintájának több hígításában az expresszió - a nem rákos minta azonos hígításaiban megfigyelhetőhöz képest - kétszeres vagy még nagyobb mértékű növekedését detektáljuk.

A találmány egy másik megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti készítmények rák progressziójának markereként alkalmazhatók. E megvalósítási mód szerint a rák diagnosztizálására fentebb leírt teszteket időről időre elvégezzük, és meghatározzuk a reaktív polipeptid(ek) vagy polinukleotid(ok) mennyiségének változását. Például, a teszteket hat hónaptól egy évig terjedő időtartamban 24-72 óránként megismételjük (szükség szerint később is). A rák jellemzően azon betegekben mutat progressziót, akikben a polipeptid vagy polinukleotid detektált mennyisége az idő előrehaladtával növekszik. Ezzel szemben, a rák nem progresszív, ha a reaktív polipeptid vagy polinukleotid mennyisége az idő előrehaladásával állandó marad vagy csökken.

Bizonyos in vivo diagnosztikai tesztek közvetlenül a tumoron végezhetők. Az egyik ilyen vizsgálati eljárás során tumorsejteket kötőreagenssel érintkeztetünk, majd a megkötött kötőreagenst közvetlenül vagy - riporter csoport alkalmazásával - közvetve detektáljuk. Az ilyen kötőreagensok szövettani alkalmazásokra is hasznosak. Más módon, ilyen célokra polinukleotid-próbák is alkalmazhatók.

Ahogy fentebb említettük, az érzékenység javítása érdekében egy adott mintában több tumorprotein-marker is tesztelhető. A különböző, találmány szerinti proteinekre specifikus kötőreagensok párhuzamosan is alkalmazhatók. A tumorprotein-markerek - az optimális érzékenységet biztosító kombinációk megállapítása céljából - rutinszerű kísérleti módszerekkel választhatók ki. Ezen túlmenően, vagy más módon, a tumorproteinek találmány szerinti kimutatási tesztjei egyéb, ismert tumorantigének kimutatási tesztjeivel kombinálhatók.

A találmány egy további szempontjának megfelelően reagenskészleteket tárunk fel a találmány szerinti diagnosztikai eljárásokban történő alkalmazásra. A találmány szerinti

reagenskészletek rendszerint két vagy több - diagnosztikai teszt végrehajtásához szükséges - komponenset tartalmaznak. A komponensek lehetnek vegyületek, reagensek, tartályok és/vagy felszerelések. Például, a reagenskészlet egyik tartálya tumorproteint specifikusan megkötő monoklonális antitestet vagy antitest-fragmenst tartalmaz. A reagenskészlet az ilyen antitesteket vagy fragmenseket, a fentebb leírtak szerint, szilárd hordozóhoz kapcsolva tartalmazhatja. A reagenskészlet egy vagy több további tartálya a teszt végrehajtására alkalmazható komponenseket (pl. reagenseket vagy puffereket) tartalmazhat. Ezen túlmenően, vagy más módon, a találmány szerinti reagenskészletek fentebb leírt detektálóreagenst is tartalmazhatnak, amely az antitest kötődésének közvetlen vagy közvetett kimutatására alkalmas riporter csoportot tartalmaz.

Más módon, előállíthatók olyan reagenskészletek, amelyek tumorproteint kódoló mRNS biológiai mintában jelenlévő mennyiségének meghatározására alkalmazhatók. Az ilyen reagenskészletek legalább egy olyan oligonukleotid-próbát vagy láncindító oligonukleotidot tartalmaznak, amely tumorproteint kódoló polinukleotidhoz képes hibridizálódni. Az ilyen oligonukleotidok, például, polimeráz-láncreakcióban vagy hibridizációs tesztben alkalmazhatók. A szóban forgó reagenskészletek további, lehetséges komponensei közé tartozik egy második oligonukleotid és/vagy diagnosztikai reagens vagy tartály, amely elősegíti a tumorproteint kódoló polinukleotid kimutatását.

A találmány szerinti megoldást a továbbiakban kísérleti példák bemutatásával szemlétetjük. A kísérleti példákban leírt megvalósítási módok nem jelentik a találmány oltalmi körének korlátozását.

1. példa

Emlőtumor-specifikus cDNS-szekvenciák előállítása differenciális "display" RT-PCR technikával

E példában emlőtumor-specifikus polipeptideket kódoló cDNS-molekulák differenciális "display" szkrínelés alkalmazásával történő előállítását ismertetjük.

A) B18Ag1-cDNS előállítása és az mRNS-expresszió karakterizálása

Emlőrákos beteg emlőtumor-szövetéből és normál szövetéből szövetmintákat készítettünk (az emlőrákot a minták gyűjtése után végzett patológiai vizsgálattal igazoltuk). A mintákból normál RNS-t és tumor-RNS-t vontunk ki és izoláltunk, majd (dT)12AG (130. azonosítószámú szekvencia) kihorgonyozott 3' -láncindító alkalmazásával cDNS-sé alakítottuk. A differenciális "display" polimeráz-láncreakciót ezután véletlenszerűen kiválasztott

láncindító (CTTCAACCTC; 103. azonosítószámú szekvencia) alkalmazásával hajtottuk végre. Az amplifikációt 1,5 mM MgCl₂-ot, 20 pmol láncindítót, 500 pmol dNTP-t és 1 egység Taq-DNS-polimerázt (Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA) tartalmazó standard pufferben, a következő inkubálási séma szerint, 40 ciklus ismétlésével végeztük: ciklusonként 94 °C-on 30
5 másodperces denaturáció, 42 °C-on egy perces hibridizáció és 72 °C-on 30 másodperces lánc-hosszabbítás. Az amplifikáció eredményeként 76 amplifikált terméket tartalmazó RNS-ujjlenyomatot ("fingerprint") kaptunk. Bár az emlőtumorszövet RNS-ujjlenyomata több, mint 98 %-ban azonos volt a normál emlőszövetével, egy csíkot ismételt is specifikusnak találunk a tumor RNS-ujjlenyomat mintázatára. Ezt a csíkot kivágtuk az ezüsfestéssel vizualizált
10 gélből, majd T-vektorba (Novagen, Madison, WI, USA) szubklónoztuk és szekvenáltuk.

E cDNS (B18Ag1) nukleotidszekvenciáját a szekvencialista 1. azonosítószámú szekvenciájaként mutatjuk be. GENBANK és EMBL adatbázisokban végzett kereséssel kimutattuk, hogy az eredetileg klónozott B18Ag1-fragmens 77 %-ban azonos az endogén S71 humán retrovirális elemmel, amely a majom sarcoma vírussal (SSV) homológ, lerövidített retrovirális
15 elem. Az S71 egy nem teljes gag-gént, a pol-gén részletét, valamint, 3' -terminálisán, LTR-szerű struktúrát tartalmaz [ld. Werner és mtsai.: Virology 174, 225 (1990)]. Ugyanakkor, a B18Ag1-fragmens 64 %-ban azonos az SSV P30-lokuszáinak (gag-lokusz) megfelelő régiójával. A B18Ag1 három elkülönült és nem teljes leolvasási fázist tartalmaz, melyek az emlőseket fertőző retrovírusok különféle gag-proteinjeivel jelentős mértékű homológiát mutató régiót
20 fednek le. Ezen túlmenően, az S71 retrovirális elemmel mutatott homológia nem csupán a gag-géneken belül létezik, hanem egy hosszú terminális ismétlődést (LTR) magában foglaló, több kilobázisos szekvenciára is érvényes.

B18Ag1-specifikus láncindító oligonukleotidokat számítógépes analízis alapelveinek alkalmazásával szintetizáltunk. Reverz transzkriptázos PCR-amplifikációval (40 inkubálási
25 ciklus, ciklusonként 94 °C, 30 másodperc; 60 °C→42 °C; 30 másodperc és 72 °C, 30 másodperc) igazoltuk, hogy a B18Ag1 valódi mRNS-szekvenciát reprezentál, amely a páciensből származó emlőtumorszövetben viszonylag nagy mennyiségben van jelen. Az amplifikációra alkalmazott láncindító oligonukleotidok a következők: B18Ag1-1 (CTG CCT GAG CCA CAA ATG; 128. azonosítószámú szekvencia) és B18Ag1-4 (CCG GAG GAG GAA GCT
30 AGA GGA ATA; 129. azonosítószámú szekvencia), melyeket 3,5 mM magnézium-koncentrációnál és 8,5-es pH-n használtunk, illetve B18Ag1-2 (ATG GCT ATT TTC GGG GCC TGA CA; 126. azonosítószámú szekvencia) és B18Ag1-3 (CCG GTA TCT CCT CGT GGG TAT T; 127. azonosítószámú szekvencia), melyeket 2 mM magnézium-koncentrációnál

és 9,5-es pH-n használtunk. Azonos kísérleti feltételek mellett ugyanezen páciens normál emlőszövetében rendkívül kis mértékű expressziót tudtunk kimutatni (vagy egyáltalán nem sikerült; ld. 1. ábra). Ezt követően a reverz transzkriptázos polimeráz-láncreakciós (RT-PCR) analízis alkalmazásával kimutattuk, hogy a B18Ag1-mRNS további kilenc (brazil és amerikai

5 páciensekből származó) tumormintában is jelen van, e páciensek normál emlőszövetében azonban rendkívül kis mennyiségben (vagy egyáltalán nem) található. RT-PCR-analízissel kimutattuk továbbá, hogy különféle normál szövetekben (köztük nyirokcsomóban, szívizom-

10 ban és májszövetben) a B18Ag1-transzkriptum nincs jelen, perifériás vér egymagvú sejtjeiben (PBMC) és tüdőszövetben pedig viszonylag kis mennyiségben mutatható ki. A B18Ag1-mRNS jelenlétét emlőtumormintában, illetve hiányát a normál emlőszövetben Northern-blot analízissel is igazoltuk (ld. 2. ábra).

A B18Ag1 emlőtumorszövetekben tapasztalható, eltérő mértékű expresszióját RNáz-védettségi tesztekkel is igazoltuk. A 3. ábrán a B18Ag1-mRNS - négy különböző RNáz-védettségi teszt alkalmazásával - különböző szövettípusokban meghatározott mennyiségét hasonlítjuk össze. A következő forrásokból származó mRNS-ek mennyiségét vizsgáltuk: 1-12.

15 oszlopok: különböző normál emlőszövetminták; 13-25. oszlopok: különböző emlőtumorminták; 26-27. oszlopok: normál prosztataminták; 28-29. oszlopok: prosztatatumor-minták; 30-32. oszlopok: vastagbél-tumor-minták; 33. oszlop: normál aorta; 34. oszlop: normál vékonybél; 35. oszlop: normál bőr; 36. oszlop: normál nyirokcsomó; 37. oszlop: normál petefészek; 38. oszlop: normál máj; 39. oszlop: normál vázizomszövet; 40. oszlop: első normál gyomorminta; 41. oszlop: második normál gyomorminta; 42. oszlop: normál tüdő; 43. oszlop: normál vese; 44. oszlop: normál hasnyálmirigy. Az egyes kísérletek eredményeinek összehasonlítását ismert β -aktin-mRNS pozitív kontroll alkalmazásával segítettük elő, és a különböző tesztek eredményeit e pozitív kontrollra normalizáltuk.

20

25 Az RT-PCR-analízis és Southern-blot analízis eredményei alapján kimutattuk, hogy a B18Ag1-lokuszt a humán genomi DNS-ben egykópiás endogén retrovirális elemként van jelen. Próbaként az eredeti B18Ag1-szekvencia alkalmazásával hozzávetőleg 12-18 kb-os genomi klónt izoláltunk. XbaI-endonukleázzal végzett emésztéssel négy további szubklónt is izoláltunk. E klónok XbaI-emésztéssel kapott végeiből további retrovirális szekvenciákat (3-10.

30 azonosítószámú szekvenciák) is kaptunk. Ezek pozícióit a 4. ábrán mutatjuk be, amelyen a 3. azonosítószámú szekvencia jelölése: "10", a 4. azonosítószámú szekvencia jelölése: "11-29", az 5. azonosítószámú szekvencia jelölése: "3", a 6. azonosítószámú szekvencia jelölése: "6", a 7. azonosítószámú szekvencia: "12", a 8. azonosítószámú szekvencia jelölése: "13", a 9. azo-

nosítószámú szekvencia jelölése: "14", és a 10. azonosítószámú szekvencia jelölése: "11-22".

További kísérleteink eredményei azt bizonyítják, hogy a 12-18 kb-os genomi klón kb. 7,75 kb-os retrovirális elemet tartalmaz (ld. 5/A és 5/B ábra). E retrovirális elem szekvenciáját a 141. azonosítószámú szekvenciaként mutatjuk be. Az 5/A ábra felső részén látható, számozott vonal a retrovirális genomi klón szensz szálának szekvenciáját reprezentálja. A vonal alatt a restrikciós helyek pozícióit tüntettük fel. A nyilak a retrovirális elem szekvenálására alkalmazott, különböző átfedő klónokat jelzik. A nyilak iránya azt jelzi, hogy az egyszálú szubklón-szekvencia a szensz vagy anti-szensz szálnak felel-e meg. Az 5/B ábrán a B18Ag1-szekvenciát tartalmazó retrovirális elem sematikus diagramja látható, amelyen feltüntettük a virális gének elemen belüli szerveződését. Az üres vízszintes sávok az elem teljes hosszában megjósolt (metioninnal kezdődő) leolvasási fázisoknak felelnek meg. Mind a hat valószínű leolvasási fázist feltüntettük (ld. a sávok bal oldalán). Az 1-3. leolvasási fázisok a szensz szálon elhelyezkedőknek felelnek meg.

Próbaként az 1. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó cDNS alkalmazásával egy hosszabb cDNS-t kaptunk (227. azonosítószámú szekvencia), amely a 141. azonosítószámú szekvenciaként bemutatott genomi szekvenciához képest tartalmaz csekély (1 % alatti) eltéréseket.

B) Egyéb emlőtumor-specifikus polipeptideket kódoló cDNS-molekulák előállítás

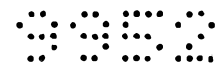
A fentebb leírtak szerint normál RNS-t és tumor-RNS-t készítettünk, majd mRNS-t izoláltunk, melyet kihorgonyozott (dT)12AG 3' -láncindító alkalmazásával cDNS-sé alakítottunk. Ezt követően a 87-125. azonosítószámú szekvenciákat tartalmaz, véletlenszerűen kiválasztott láncindítók - és a fentebb leírt amplifikációs feltételek - alkalmazásával differenciális "display" polimeráz-láncreakciót végeztünk. A tumor RNS-ujjlenyomat mintázatára specifikus csíkokat kivágtuk az ezüsfestéssel vizualizált gélről, majd T-vektorba (Novagen, Madison, WI, USA) vagy pCRII-vektorba (Invitrogen, San Diego, CA, USA) szubklónoztuk és szekvenáltuk. A szekvenciákat a 11-86. azonosítószámú szekvenciákként mutatjuk be. Az izolált 79 szekvencia közül 67 bizonyult újnak (11-26. és 28-77. azonosítószámú szekvenciák; ld. még a 6-20. ábrákat).

További kísérleteink eredményeként a B15Ag1-antigén meghosszabbított DNS-szekvenciáját (290. azonosítószámú szekvencia) kaptuk (melynek eredetileg azonosított, részleges szekvenciáját a 27. azonosítószámú szekvenciaként mutatjuk be). A 290. azonosítószámú szekvencia adatbázisokban fellelhető gének szekvenciáival végzett összehasonlításával az ismert humán β -A aktivin-gén szekvenciájával mutattunk ki homológiát. Más kísérleteink

eredményeként a B21GT2-antigén (más néven B311D) teljes hosszúságú cDNS-szekvenciáját is izoláltuk (ennek eredetileg azonosított, részleges cDNS-szekvenciáját az 56. azonosítószámú szekvenciaként mutatjuk be). A teljes hosszúságú szekvenciát a 307. azonosítószámú szekvenciaként, a megfelelő aminosav-szekvenciát pedig a 308. azonosítószámú szekvenciaként mutatjuk be. Izoláltuk a B311D "splicing"-változatát is. A 316. azonosítószámú szekvencia B311D-klónt szekvenáltuk, majd XhoI/NotI-fragmensét gélelektroforézissel tisztítottuk, és random láncindítók alkalmazásával 32P-cDTP-vel jelöltük, hogy további B311D-génszekvenciák azonosítására végzett szkríneléshez próbaként alkalmazhassuk. A humán emlőtumor-cDNS bakteriális könyvtárának két részletét standard technikák alkalmazásával szkríneltük. Az ilyen módon izolált egyik klón egy további - poli-A+-farkat tartalmazó szekvenciát eredményezett. E klón (B311D BT1 1A) meghatározott cDNS-szekvenciáját a 317. azonosítószámú szekvenciaként mutatjuk be. A 316. és 317. azonosítószámú szekvencia egy 464 bp-os régióban azonosnak bizonyult azokkal a szekvenciákkal, amelyek a 317. azonosítószámú szekvencia poli-A+-szekvenciájának közelében térnek el egymástól.

További kísérleteinkben újabb 146 szekvenciát azonosítottunk (142-289. azonosítószámú szekvenciák), melyek közül 115 bizonyult újnak (142., 143., 146-152., 154-166., 168-176., 178-192., 194-198., 200-204., 206., 207., 209-214., 216., 218., 219., 221-240., 243-245., 247., 250., 251., 253., 255., 257-266., 268., 269., 271-273., 275., 276., 278., 280., 281., 284., 288. és 291. azonosítószámú szekvenciák). Legjobb tudomásunk szerint a korábban izolált szekvenciák egyikéről sem mutatták ki, hogy humán emlőtumorszövetben nagyobb mennyiségben expresszálnának, mint normális emlőszövetben.

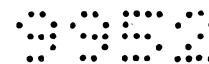
Újabb kísérleteinkkel a B11Ag1-antigén (más néven B305D) több különböző "splicing"-alakját izoláltuk, melyek mindegyike a B11Ag1 leolvasási fázisának némileg eltérő változatát tartalmazta. A "splice junction" szekvenciák egyedi exonokat definiálnak, amelyek - különböző mintázatokban és elrendezésekben - a különböző "splicing"-alakokat alkotják. Az egyes exonok expressziós mintázatának RT-PCR-analízissel végzett tanulmányozása céljából (ld. később) láncindítókat terveztünk. Mindegyik exon azonos expressziós mintázatot mutatott, mint az eredeti B11Ag1-klón: az expresszió emlőtumorszövetre, normál prosztataszövetre és normál hereszövetre bizonyult specifikusnak. Az izolált, proteint kódoló exonok meghatározott cDNS-szekvenciáit a 292-298. azonosítószámú szekvenciákként mutatjuk be. A 292. és 298. azonosítószámú nukleotidszekvenciának megfelelő, megjósolt aminosav-szekvenciákat a 299., illetve 300. azonosítószámú szekvenciaként mutatjuk be. A B11Ag1 egyik "splicing"-alakjára specifikus 5' -láncindító alkalmazásával végzett RACE-eljárással (cDNS-



végek gyors amplifikációs eljárása) emlő-adenokarcinomából további három rokon "splicing"-
izoalakot (B11C-15, B11C-8 és B11C-9,16) sikerült izolálni. Ezen izoalakok meghatározott
cDNS-szekvenciáit a 301., 302., illetve 303. azonosítószámú szekvenciaként, a megfelelő,
megjósolt aminosav-szekvenciákat pedig a 304., 305., illetve 306. azonosítószámú szekven-
ciaként mutatjuk be.

GenBank DNS-adatbázis BLASTN-programmal végzett átvizsgálásához keresőszek-
venciaként a B11C-15-izoalak (301. azonosítószámú szekvencia; más néven B305D C-
izoalak) kódolórégióját alkalmaztuk, és a 21. kromoszómáról származó egyik genomi klónnal
(nyilvántartási szám: AP001465) egyezést találtunk. A 21. kromoszóma - B305D-szekvenciá-
nak megfelelő - feltételezett exonjának (vagy kódolószekvenciájának) azonosítására a
BLASTN-program adatkihozatalából kapott páronkénti egymás alá rendezéseket
("alignment") alkalmaztuk. A BLASTN páronkénti egymás alá rendezések alapján a GenBank
AP001465 nyilvántartású klónjának alábbi részleteit raktuk össze: 67978-68499. bp, 72870-
72987. bp, 73144-73335. bp, 76085-76206. bp, 77905-78085. bp, 80520-80624. bp és 87602-
87633. bp. Ezt a szekvenciát - "DNA Star Seqman" program alkalmazásával - a B303D C-
izoalak szekvenciájával rendeztük egymás alá, és a felesleges szekvenciát úgy távolítottuk el,
hogy a szekvencia a lehető legnagyobb mértékben hasonlítson a B305D-hez. A 21. kromo-
szóma végső, szerkesztett alakja 96,5 %-ban volt azonos a B305D-szekvenciával. A 21. kromo-
szóma végeredményként kapott, szerkesztett szekvenciáját ezután transzlációnak vetettük
alá, és azt találtuk, hogy stop-kodont csak a B305D-szekvenciáéval azonos pozícióban tartal-
maz. Hasonlóan a B305D-hez, a 21. kromoszóma szekvenciája (325. azonosítószámú szek-
vencia) 384 aminosavas proteint kódol (326. azonosítószámú szekvencia). E protein amino-
sav-szekvenciáját a B305D C-izoalak által kódolt protein aminosav-szekvenciájával egymás
alá rendezve 90 %-os aminosav-azonosságot tapasztaltunk.

A "High Throughput Genome Sequencing" (HTGS) adatbázis (NCBI, National
Institutes for Health, Bethesda, MD) homológok azonosítása céljából történő átvizsgálására a
B305D C-izoalak cDNS-szekvenciáját (301. azonosítószámú szekvencia) alkalmaztuk. Ho-
mológokat a 2. kromoszómán (9838181-es klón), a 10. kromoszómán (10933022-es klón) és a
15. kromoszómán (11560284-es klón) azonosítottunk. Ezek a homológok a B305D C-
izoalakjával - nukleinsav szinten - 90 %-nál nagyobb azonosságot mutattak. Mindhárom klón
384 aminosavat kódoló nyitott leolvasási fázist tartalmaz, amely a 304. azonosítószámú ami-
nosav-szekvenciával 90 %-nál nagyobb mértékben azonos. A GenBank adatbázis 301. azono-
sítószámú szekvenciával végzett további átvizsgálásának eredményeként a 22. kromoszómán



egy részleges szekvenciájú homológot (5931507-es klón) azonosítottunk. A 2., 10., 15. és 22. kromoszómán lévő homológok cDNS-szekvenciáit a 327-330. azonosítószámú szekvenciákként mutatjuk be, míg a megfelelő aminosav-szekvenciák sorrendben a 331., 334., 333., illetve 332. azonosítószámú szekvenciaként kerülnek bemutatásra.

5 A B305D A-izolalakjával (cDNS: 292. azonosítószámú szekvencia) végzett vizsgálatokban a 313. azonosítószámú szekvenciaként bemutatott cDNS-szekvenciáról megállapítottuk, hogy a 884. pozícióban egy plusz guanint tartalmaz, ami a nyitott leolvasási fázis eltolódását eredményezi. E nyitott leolvasási fázis meghatározott DNS-szekvenciáját a 314. azonosítószámú szekvenciaként mutatjuk be. Ez a fáziseltolódás 293 aminosavas proteint eredményez (315. azonosítószámú aminosav-szekvencia), amely - a B305D többi izolalakjára közösen jellemző, de az N-terminális régióban eltérő - C-terminális domént tartalmaz.

10

2. példa

B18Ag1-DNS előállítása humán genomi DNS-ből

15 Ebben a példában a B18Ag1-DNS humán genomi DNS-ből történő amplifikációval végzett előállítását ismertetjük.

A B18Ag1-DNS 250 ng humán genomi DNS-ből, 20-20 pmol B18Ag1-specifikus láncindítókat, 500-500 pmol dNTP-eket és egy egység Taq-DNS-polimerázt (Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA) tartalmazó reakcióelegyben, a következő amplifikációs paraméterek alkalmazásával állítható elő: 94 °C-on 30 másodperces denaturáció; 30 másodperces hibridizáció 60 °C-on (minden második ciklusban 2 °C-kal csökkentett hőmérsékleten, egészen 42 °C-ig); és 72 °C-on 30 másodperces lánchosszabbítás. Az inkubálást a hibridizációs hőmérséklet utolsó csökkentése után (42 °C-on) 25 cikluson keresztül végeztük. A láncindító oligonukleotidokat számítógépes analízissel választottuk ki, és a következőket alkalmaztuk:

20

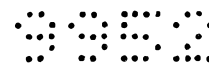
25 B18Ag1-1, B18Ag1-2, B18Ag1-3 és B18Ag1-4. Láncindító-párként az 1+3, 1+4, 2+3 és 2+4 kombinációkat alkalmaztuk.

Gélelektroforézissel végzett elválasztást követően a B18Ag1-DNS-nek megfelelő sávot kivágtuk a gélről, és a DNS-t megfelelő vektorba klónoztuk.

30 3. példa

B18Ag1-DNS előállítása emlőtumor-cDNS-ből

Ebben a példában a B18Ag1-DNS humán emlőtumor-cDNS-ből történő amplifikációval végzett előállítását ismertetjük.



A cDNS első szálát humán emlőtumorszövetből kivont RNS-ből szintetizáltuk. A szintézist a következő összetételű reakcióelegyben végeztük: 30 µl végtérfogatban 500 ng poli-A⁺-RNS; 200 pmol (T)₁₂AG láncindító (TTT TTT TTT TTT AG; 130. azonosítószámú szekvencia), 1x töménységű első szál reverz transzkriptáz puffer; 6,7 mM DTT; mindegyik
5 dNTP-ből 500 mmol; és egy egység AMV vagy MMLV reverz transzkriptáz (bármely forgalmazótól, pl. Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA). Az első szál szintézise után a cDNS-t hozzávetőleg 25-szörös térfogatúra hígítottuk, és a 2. példában leírtak szerint végzett amplifikációhoz a kapott oldat 1 µl-t használtuk. Bár néhány láncindító-pár heterogén transzkriptumpopulációt eredményez, a B18Ag1-2 (5' ATG GCT ATT TTC GGG GGC TGA CA; 126.
10 azonosítószámú szekvencia) és B18Ag1-3 (5' CCG GTA TCT CCT CGT GGG TAT T; 127. azonosítószámú szekvencia) egyetlen 151 bp-os amplifikációs terméket eredményezett

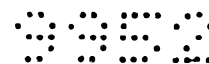
4. példa

A B18Ag1 B-sejt- és T-sejt-epitópjainak azonosítása

15 Ebben a példában a B18Ag1 epitópjainak azonosítását ismertetjük.

A B18Ag1-szekvencia különféle számítógépes algoritmusok alkalmazásával szkrínelhető. A B-sejt-epitópok azonosítása céljából a szekvenciát - a Hopp által leírt eljárás [Prog. Clin. Biol. Res. 172B, 367 (1985)], vagy más módon, a Cease és mtsai. [J. Exp. Med. 164, 1779 (1986)], illetve Spouge és mtsai. [J. Immunol. 138, 204 (1987)] által leírt eljárás alkalmazásával - hidrofóbitási vagy hidrofilitási értékre szkrínelhetjük. További MHC II. osztályú
20 (antitest- vagy B-sejt-) epitópok, például, az AMPHI-programmal [ld. pl. Margalit és mtsai.: J. Immunol. 138 2213 (1987)] vagy Rothbard és Taylor eljárásaival [ld. EMBO J. 7, 93 (1998)] jósolhatók meg.

Miután e technikák alkalmazásával sikerült 15-20 aminosavas peptideket azonosítani, automatizált peptidszintetizáló készülék (pl. Perkin Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA) és megfelelő technikák, mint pl. a Merrifield-szintézis alkalmazásával különálló peptidek szintetizálhatók. A szintézist követően a peptidek egészséges vagy emlőrákos páciensektől vett szérum szkrínelésére alkalmazhatók, miáltal meghatározható, hogy mely
25 az emlőrákos páciensek hordoznak-e a peptidekkel reaktív antitesteket. Az ilyen antitestek jelenléte az emlőrákos páciensek szérumában igazolhatja a vizsgált specifikus B-sejt-epitóp immunogenitását. A peptidek arra is tesztelhetők, hogy különféle állatokban (egerekben, patkányokban, nyulakban, csimpánzokban, stb.) in vivo immunizálást követően képesek-e szelológiai vagy humorális immunitást generálni. Ha az ilyen immunizálás után peptidspecifikus
30



antiszérum termelődik, az szintén a vizsgált specifikus B-sejt-epitóp immunogenitását igazolja.

A T-sejt-epitópok azonosítása céljából a B18Ag1-szekvencia különféle számítógépes algoritmusok alkalmazásával szkrínelhető, melyek hasznosak a B18Ag1-szekvenciáján belüli
5 - HLA I. osztályú MHC-molekulákhoz történő kötődésre képes - 8-10 aminosavas motívumok azonosítására [ld. pl. Rammensee és mtsai.: Immunogenetics 41, 178 (1995)]. A szintézist követően a kapott peptidek - standard kötési tesztek alkalmazásával [ld. pl. Sette és mtsai.: I. Immunol. 153, 5586 (1994)] - I. osztályú MHC-molekulákra vonatkozó kötődési képességükre tesztelhetők, és ami még fontosabb, betegből vagy egészséges páciensből származó perifériás
10 egymagvú sejtek in vitro stimulálását követően antigén-reaktív citotoxikus T-sejtek termelését indukáló képességükre tesztelhetők [ld. pl. Bakker és mtsai. Cancer Res. 55, 5330 (1995); Visseren és mtsai.: J. Immunol. 154, 3991 (1995); Kawakami és mtsai.: J. Immunol. 154, 3961 (1995); Kast és mtsai.: J. Immunol. 152, 3904 (1994)]. Az in vitro stimulációt követően az autológ (vagyis azonos I. osztályú MHC-molekulákat hordozó) tumorsejtek elpusztítására képes T-sejtek képződése további bizonyítékát szolgáltatja a B18Ag1-antigén immunogenitásának. Ezen túlmenően, az ilyen peptidek - egy adott humán I. osztályú MHC-haplotípus expressziójára nézve transzgenikus - egerek in vivo immunizálását követően egéreredetű peptiddel és B18Ag1-antigénnel reaktív citotoxikus T-sejtek termeltetésére alkalmazhatók [Vitiello és mtsai.: J. Exp. Med. 173, 1007 (1991)].

20 A B18Ag1-antigén megjósolt B-sejt- és T-sejt-epitópjainak reprezentatív listáját az alábbiakban mutatjuk be (megjósolt HLA I. osztályú MHC kötő antigén szerint csoportosítva):

Megjósolt Th-motívumok (B-sejt-epitópok); 131-133. azonosítószámú szekvenciák:

SSGGRTFDDFHRYLLVGI

25 QGAAQKPINLSKXIEVVQGHDE

SPGVFLEHLQEAYRIYTPFDLSA

Megjósolt HLA A2.1 motívumok (T-sejt-epitópok); 134-140. azonosítószámú szekvenciák:

YLLVGIQGA

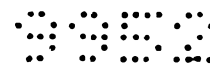
GAAQKPINL

30 NLSKXIEVV

EVVQGHDES

HLQEAYRIY

NLAFVAQAA



FVAQAAPDS

5. példa

A B11Ag1 T-sejt-epitópjainak azonosítása

5 Ebben a példában B11Ag1 (más néven B305D) epitópok azonosítását ismertetjük. A B11Ag1-génből négy peptidet (B11-8, B11-1, B11-5 és B11-12; 309-312. azonosítószámú szekvenciák) származtattunk.

Humán CD8 T-sejteket Van Tsai és mtsai. eljárása szerint [Critical Reviews in Immunology 18, 65 (1998)], dendritikus sejtek alkalmazásával in vitro B11-8-peptid ellen
10 mozgósítottunk. A kapott CD8 T-sejt-tenyészeteket - JY jelű B-LCL-vonal által prezentált - B11-8 peptidet vagy negatív kontroll peptidet felismerő képességükre teszteltük. Röviden összefoglalva: a T-sejteket 10 µg/mL peptid, 10 ng/mL IL-7 és 10 µg/mL IL-2 jelenlétében autológ monocitákkal inkubáltuk, és standard 51Cr-felszabadulási tesztben célsejteket speci-
fikusan lizáló képességükre teszteltük. Ahogy a 22. ábrán látható, a tenyészcélsejt jelentős
15 mértékben felismerte a B11-8-peptidet, míg a B11-1-peptid esetében gyengébb felismerést figyeltünk meg.

E CTL-vonal egyik klónját gyors szaporítást követően OKT3 monoklonális antitest és humán IL-2 alkalmazásával izoláltuk. A 23. ábrán jól látható, hogy ez a klón (melyet A1-nek nevezünk), azon túlmenően, hogy képes specifikus peptid felismerésére, felismerte a
20 B11Ag1-génnel transzdukált JY LCL-vonalat. Ez az eredmény azt bizonyítja, hogy a B11-8 a B11Ag1-gén természetes érési folyamaton átesett epitópja. Ezenfelül, ezekről a T-sejtekről megfigyeltük az is, hogy - HLA-A2-korlátozott módon - felismerik és lizálják a B11Ag1-et természetesen expresszáló tumorsejtvonalat (24. ábra). A T-sejtek a HLA-A2-vel transzdukált - B11Ag1-et természetesen expresszáló - tüdőadenokarcinómát igen eredményesen ismerték
25 fel, csakúgy, mint a B11Ag1-gyel transzdukált A2+ emlőkarcinómát (CAMA-1). Ezzel szemben, a nem transzdukált sejtvonalakat, illetve egy másik negatív tumorvonalat (SW620) nem ismerték fel.

Ezek az eredmények világosan bizonyítják, hogy e humán T-sejtek nemcsak a B11-specifikus peptideket, hanem a transzdukált sejteket, továbbá a természetes expressziót mutató
30 tumorvonalakat is felismerik.

A fentebb leírt eljárásokkal B11-5 és B11-12 antigén ellen mozgósított CTL-vonalakról megállapítottuk, hogy felismerik a megfelelő peptiddel bevont célsejteket.

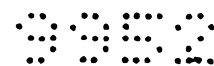
6. példa

Differenciális "display" polimeráz-láncreakcióval felismert emlőtumor-gének karakterizálása

A differenciális "display" polimeráz-láncreakcióval felismert emlőtumor-gének specifitását és szenzitivitását reverz transzkriptázos polimeráz-láncreakcióval (RT-PCR) határoztuk meg. Ez az eljárás emlőtumor-génekről átírt mRNS expressziójának gyors, félkvantitatív értékelését teszi lehetővé, anélkül, hogy nagy mennyiségű RNS alkalmazására lenne szükség. Génspecifikus láncindító oligonukleotidok alkalmazásával az mRNS-expresszió szintjét különböző szövetekben (8 emlőtumorszövet, 5 normál emlőszövet, 2 prosztata-tumor-szövet, 2 vastagbél-tumor-szövet, 1 tüdő-tumorszövet és 14 egyéb felnőtt humán szövet, köztük normál prosztata, vastagbél, vese, máj, tüdő, petefészek, hasnyálmirigy, vázizom, bőr, gyomor és here) vizsgáltuk.

A reverz transzkriptázos polimeráz-láncreakció félkvantitatív természetének biztosítása érdekében belső kontrollként mindegyik vizsgált szövet esetében β -aktint alkalmaztunk. Az első szálú cDNS-ekből hígítássorozatot készítettünk, és β -aktin-specifikus láncindító oligonukleotid alkalmazásával reverz transzkriptázos polimeráz-láncreakciókat végeztünk. Ezután kiválasztottuk a β -aktin templát lineáris amplifikációját lehetővé tevő hígítást, amely elég érzékeny volt ahhoz, hogy tükrözze a kiindulási kópiaszám különbségeit. E feltételek alkalmazásával mindegyik reverz transzkriptációban mindegyik szövetre meghatároztuk a β -aktin mennyiségét. A DNS-szennyeződést DNázos kezeléssel, illetve annak biztosításával minimalizáltuk, hogy a reverz transzkriptáz hozzáadása nélkül előállított első szálú cDNS alkalmazásakor negatív eredményt kapjunk.

Az mRNS expressziós szintjét különféle szövetekben génspecifikus láncindítók alkalmazásával határoztuk meg. RT-PCR-analízissel napjainkig 38 gént sikerült tanulmányozni, melyek közül öt (B15AG-1, B31GA1b, B38GA2a, B11A1a és B18AG1a) jó specifitást és szenzitivitást mutatott az emlőtumorokra. A 21/A és 21/B ábrán e gének közül három - B15AG-1 (27. azonosítószámú szekvencia), B31GA1b (148. azonosítószámú szekvencia) és B38GA2a (157. azonosítószámú szekvencia) - eredményeit mutatjuk be. Az 1. táblázatban a normál emlőszövetben és emlőtumorokban, valamint egyéb szövetekben tesztelt összes gén expressziós szintjét foglaljuk össze.



1. táblázat

Különböző szövetekben expresszált emlőrák-antigének százalékos aránya

Emlőszövetek	Emlőtumorokban túlzott mértékű expresszió	84 %
	Normál és tumoros szövetekben egyenlő mértékű expresszió	16 %
Egyéb szövetek	Emlőtumorokban túlzott mértékű expresszió, normál szövetekben nem mutatható ki expresszió	9 %
	Emlőtumorokban túlzott mértékű expresszió, néhány normál szövetekben kimutatható expresszió	30 %
	Emlőtumorokban túlzott mértékű expresszió, valamennyi egyéb szövetben azonos mértékű expresszió	61 %

7. példa

5 Emlőtumor-polipeptidek elleni antitestek előállítása és karakterizálása

B305D emlőtumor-antigén elleni poliklonális antitesteket a következők szerint állítottunk elő.

Rekombináns *E. coli* expressziós rendszerben termeltetett emlőtumor-antigént rázóinkubátorban, 37 °C-on egy éjszakán át a megfelelő antibiotikumokkal tenyésztettünk. A következő reggelen a tenyészet 10 mL-ét két literes, terelőlappal felszerelt Erlenmeyer-lombikban 500 mL - megfelelő antibiotikumokat tartalmazó - 2x YT-tápközeghez adtuk. Amikor a tenyészet 560 nm-nél mért optikai denzitása 0,4-0,6 értéket ért el, a sejteket 1 mM IPTG-vel indukáltuk. Az indukció után négy órával a sejteket centrifugálással begyűjtöttük, majd foszfátpufferelt sóoldattal mostuk és ismét centrifugáltuk. Ezt követően a felülúszót leöntöttük, és a sejteket későbbi felhasználás céljára lefagyasztottuk vagy azonnal feldolgoztuk. A sejttöledékhez 20 mL feltáráspuffert adtunk, és az elegyet vortexeltük. Az *E. coli* sejtek feltárása érdekében a sejtelegyet French-présben, 16000 psi (110 kPa) nyomáson kezeltük. A sejteket ezután ismét centrifugáltuk, majd a felülúszóban és az üledékben SDS-PAGE-analízissel ellenőriztük a rekombináns protein megoszlását. A sejttöledékben lokalizált proteinek izolálása céljából az üledéket 1 % CHAPS-t tartalmazó 10 mM Tris-pufferben (pH = 8,0) újraszuszpendáltuk, a zárványtest-üledéket mostuk és ismét lecentrifugáltuk. Ezt az eljárást még kétszer megismételtük. A leöblített zárványtest-üledéket 8 M karbamiddal vagy 6 M guanidinnel (10 mM Tris, pH = 8,0 + 10 mM imidazol jelenlétében) szolubilizáltuk. A szolubilizált proteint 5 ml nikkel-kelát gyantához (Qiagen) adtuk, és folytonos keverés mellett szobahőmérsékleten 45 percig inkubáltuk. Inkubálás után a gyanta és protein elegyét eldobható oszlopon folyattuk

át, és az elfolyót összegyűjtöttük. Az oszlopot ezután 10-20-szoros oszloptérfogatnyi szolubilizáló pufferrel mostuk, majd az antigént 8 M karbamid, 10 mM Tris (pH = 8,0) és 300 mM imidazol összetételű pufferrel eluáltuk, és 3 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. A további tisztítás céljából összeöntendő frakciók azonosítása érdekében SDS-PAGE-analízist végeztünk.

5 Utolsó tisztítási lépésként erős anioncserélő gyantát (pl. HiPrepQ; Biorad) megfelelő pufferrel ekvilibráltunk, és az összeöntött frakciókat az oszlopra töltöttük. Az antigént egyre növekvő sókoncentráció alkalmazásával eluáltuk, frakciókat gyűjtöttünk, majd az összeöntendő frakciók kiválasztása érdekében SDS-PAGE-analízist végeztünk. Az összeöntött frakciókat 10 mM Tris-pufferrel (pH = 8,0) szemben dializáltuk. A proteint 0,22 µm-es szűrőn fiolákba
10 szűrtük, és további felhasználásig lefagyasztva tároltuk.

 A B305D-antigén 400 µg-ját 100 µg muramil-dipeptiddel (MDP) elegyítettük. Nyulaknak négyhetente - azonos térfogatú inkomplett Freund-féle adjuvánssal (IFA) - elegyítve 100 µg dóziszú emlékeztetőoltásokat adtunk. Az egyes emlékeztetőoltások után az állatoktól vért vettünk, s a vérsavó elkülönítése érdekében a vért 12-24 óra hosszat 4 °C-on inkubáltuk,
15 majd centrifugáltuk.

 96 üregű tálcákat 4 °C-on 20 órás inkubálással B305D-antigén 50 µl oldatával (jellemzően 1 µg rekombináns protein) vontunk be. Az üregekhez ezután 250 µL BSA blokkoló-puffert adtunk, és szobahőmérsékleten két óra hosszat inkubáltuk. Ezt követően a tálcákat 0,01 % Tween-t tartalmazó foszfátpufferelt sóoldattal mostuk, és mindegyik üreghez foszfátpufferelt sóoldattal hígított vérsavót (50 µl) adtunk, és az inkubálást szobahőmérsékleten 30
20 percig folytattuk. Az inkubálás után a tálcákat a fentiek szerint mostuk, majd mindegyik üreghez 1:10 000 hígítású kecskeeredetű anti-nyúl Ig/tormaperoxidáz (HRP) konjugátumot (50 µL) adtunk. A tálcákat a fenti módon ismét leöblítettük, és mindegyik üreghez 100 µL TMB "microwell" peroxidáz-szubsztrátot adtunk. Sötétben, szobahőmérsékleten végzett 15 perces
25 inkubálás után a kolorimetriás reakciót 100 µl 1N kénsavval leállítottuk, s közvetlenül ezután 450 nm-nél meghatároztuk a jelintenzitást. A poliklonális antitestek immunreaktívnek bizonyultak a B305D-antigénnel.

 A B305D-expresszió immunhisztokémiai (IHC) analízisét emlőtumor- és normál emlőszövet-mintákban a következők szerint végeztük. Előzetesen paraffinba ágyazott szövetekből 8 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Az optimális festődési feltételek megvalósítása érdekében 0,1 M nátrium-citrát pufferben (pH = 6,0) gőzhevítéssel indukált epitópvisszanyerést ("steam heat induced epitope retrieval"; SHIER) alkalmaztunk. A metszeteket 5

percig 10 % vérsavót tartalmazó foszfátpufferelt sóoldattal inkubáltuk, majd mindegyik met-szethez hozzáadtuk az első antitest megadott koncentrációit (25 perces inkubálás), majd biotinilált anti-nyúl vagy anti-egér antitesttel újabb 25 perces inkubálást végeztünk. Az endo-
5 gén peroxidáz-aktivitást hidrogén-peroxiddal végzett három, 1,5 perces inkubálással blokkol-
tuk. Az antigén expressziójának láthatóvá tétele érdekében - DAB-kromogénnel együtt - az
avidin-biotin komplex/tormaperoxidáz (ABC/HRP) rendszert alkalmaztuk. A tárgylemezek
utánszínezésére hematoxilint használtunk. A B305D-expressziót emlőtumorban és normál
tumorszövetben egyaránt kimutattuk, azonban a festődés intenzitása a normál mintákban sok-
kal kisebb volt, mint a tumormintákban, és a B305D felületi expresszióját csak emlőtumor-
10 szövetekben tapasztaltuk.

A B305D sokféle normál szövetben végzett valós idejű PCR-analízisének és immun-
hisztokémiai vizsgálatának eredményeit az alábbi, 2. táblázatban foglaljuk össze. A táblázat-
ban látható adatok alapján, a B305D minimális mértékben termelődik a herékben, epehólyag-
ban nem kaptunk bizonyító erejű eredményeket, míg az összes többi szövetben nem mutatható
15 ki B305D-expresszió.

2. táblázat

mRNS	IHC-festődés	Szövettípus	Összegzés
Mérsékelten po- zítív	Pozitív	Here	Spermatidák kis hányadában sejt- magi festődés; spermatozoa nega- tív; siminoma negatív
Negatív	Negatív	Thymus	Nincs expresszió
N/A	Negatív	Artéria	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Vázizom	Nincs expresszió
Negatív	Pozitív (gyenge fes- tődés)	Vékonybél	Nincs expresszió
Negatív	Pozitív (gyenge fes- tődés)	Petefészek	Nincs expresszió
Negatív		Hipofízis	Nincs expresszió

2. táblázat (folytatás)

Negatív	Pozitív (gyenge fes- tődés)	Gyomor	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Gerincvelő	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Lép	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Húgyvezeték	Nincs expresszió
N/A	Negatív	Epehólyag	Nincs bizonyíték
N/A	Negatív	Placenta	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Pajzsmirigy	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Szív	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Vese	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Máj	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Agy/kisagy	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Vastagbél	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Bőr	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Csontvelő	Nincs expresszió
N/A	Negatív	Mellék- pajzsmirigy	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Tüdő	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Nyelőcső	Nincs expresszió
Negatív	Pozitív (gyenge fes- tődés)	Méh	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Mellékvese	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Hasnyálmirigy	Nincs expresszió
N/A	Negatív	Nyirokcsomó	Nincs expresszió
Negatív	Negatív	Agykéreg	Nincs expresszió
N/A	Negatív	Petevezeték	Nincs expresszió
Negatív	Pozitív (gyenge fes- tődés)	Húgyhólyag	Nincs expresszió

2. táblázat (folytatás)

Negatív	N/A	Csont	Nincs expresszió
Negatív	N/A	Nyálmirigy	Nincs expresszió
Negatív	N/A	Aktivált PBMC	Nincs expresszió
Negatív	N/A	Nyugvó PBMC	Nincs expresszió
Negatív	N/A	Légcső	Nincs expresszió
Negatív	N/A	Vena cava	Nincs expresszió
Negatív	N/A	Retina	Nincs expresszió
Negatív	N/A	Porc	Nincs expresszió

8. példa

Emlőtumor antigének termeltetése

Ebben a példában a B305D emlőtumor-antigén E. coli sejtekben és emlőseredetű
5 sejtekben végzett termeltetését és tisztítását ismertetjük.

A B305D C-15-ös izoalakjának (301. azonosítószámú szekvencia; transzlációja 384
aminosavas proteint eredményez) E. coli sejtekben történő expresszáltatása érdekében a
B305D C-15 izoalakot pET17B-plazmidba (az M. tuberculosis Ra12-antigén első 30 amino-
savát kódoló szekvenciától 3' -irányba) klónoztuk. Először a B305D nyitott leolvasási fázisá-
10 nak belső EcoRI-felismerési helyét az aminosav-szekvencia megváltoztatása nélkül mutageni-
záltuk, hogy a gént az Ra12-n belüli EcoRI-helyre klónozhassuk. A helyspecifikus mutagene-
zishez az AW012-láncindítót (319. azonosítószámú szekvencia) és az AW013-láncindítót
(320. azonosítószámú szekvencia) alkalmaztuk. A EcoRI-helyén módosított B305D nyitott le-
olvasási fázisát az AW014-es (321. azonosítószámú szekvencia) és AW015-ös láncindító
15 (322. azonosítószámú szekvencia) alkalmazásával végzett polimeráz-láncreakcióval amplifi-
káltuk. A PCR-terméket EcoRI-endonukleázzal emésztettük, majd az Ra12/pET17b-vektor
EcoRI-helyére ligáltuk. A kapott fúziós konstrukció (melyet Ra12mB11C-nek neveztünk el)
szekvenciáját DNS-szekvenálással ellenőriztük. E fúziós konstrukció meghatározott cDNS-
szekvenciáját a szekvencialista 323. azonosítószámú szekvenciájaként, a kódolt aminosav-
20 szekvenciát pedig 324. azonosítószámú szekvenciaként mutatjuk be.

A fúziós konstrukciót BL21(DE3)CodonPlus-RIL E. coli törzsbe (Stratagene) transz-
fektáltuk, és a sejteket egy éjszakán át kanamicint tartalmazó LB-tápközegben szaporítottuk.
A kapott tenyészetet IPTG-vel indukáltuk. A proteint PVDF-membránra vittük, 5 % sovány

tejet tartalmazó PBS/Tween-pufferrel blokkoltuk, háromszor leöblítettük, majd egér anti-His-cimke antitesttel (Clontech) egy óra hosszat inkubáltuk. A membránt háromszor leöblítettük, és próbaként HRP-Protein-A-val (Zymed) 30 percig inkubáltuk. Végül, a membránt ismét háromszor mostuk és ECL-szubsztráttal (Amersham) előhívtuk. A protein termelődését Western-blot analízissel detektáltuk.

Emlőseredetű sejtekben történő rekombináns expresszáltatás érdekében a B305D C-15-ös izoalakját (301. azonosítószámú szekvencia; transzlációja 384 aminosavas proteint eredményez) pCEP4 és pcDNA3.1 expressziós vektorokba (Invitrogen) szubklónoztuk. A kapott konstrukciókkal - Fugene-6-reagens (Roche) alkalmazásával - HEK293-sejteket (ATCC) transzfektáltunk. Röviden összefoglalva: a HEK-sejteket 100 000 sejt/mL sejtkoncentrációban 10 % magzati borjúsérumot (FBS; Hyclone) tartalmazó DMEM-tápközegbe (Gibco) oltottuk és egy éjszakán át tenyésztettük. A következő napon 100 µL - magzati borjúsérum nélküli - DMEM-tápközeghez 2 µL Fugene-6-reagenst adtunk, és szobahőmérsékleten 15 percig inkubáltuk. A Fugene-6/DMEM elegyet 1 µg B305D/pCEP4 vagy B305D/pcDNA3.1 plazmid-DNS-hez adtuk, és szobahőmérsékleten ismét 15 perces inkubálást végeztünk. A Fugene/DNS elegyet ezután HEK293-sejtek tenyészetéhez adtuk, és 37 °C-on, 7 % CO₂-tartalom mellett 48-72 óra hosszat inkubáltuk. A sejteket foszfátpufferelt sóoldattal leöblítettük, összegyűjtöttük és centrifugáltuk.

A Western-blot analízishez a sejteket Triton-X100-at tartalmazó feltárópufferben 30 percig jégen inkubálva teljes sejtes lizátumokat hoztunk létre. A lizátumokat ezután 10 000-es percenkénti fordulatszámmal 4 °C-on 5 percig végzett centrifugálással derítettük. A mintákat - β-merkaptóetanolt tartalmazó - SDS-PAGE felvivőpufferrel hígítottuk, majd a gélre történő felvitel előtt 10 percig forraltuk. A proteineket nitrocellulóz-membránra vittük át, és próbaként protein-A-n tisztított nyúl eredetű anti-B305D poliklonális szérum (előállítását ld. fentebb) 1 µg/mL koncentrációjával inkubáltuk. A foltot HRP-vel konjugált, kecskeeredetű anti-nyúl Ig antitesttel, majd ECL-szubsztráttal végzett inkubálással tettük láthatóvá. A B305D-vel transzfektált HEK293-sejtek lizátumában sikerült a B305D-protein termelődését kimutatni, a csak vektorral transzfektált kontroll HEK293-sejtekben azonban nem.

FACS-analízis céljából a sejteket jég hideg festőpufferrel mostuk, majd kecskeeredetű anti-nyúl Ig (H+L)/FITC reagens 1:100 hígításával jégen 30 percig inkubáltuk. A sejteket ezután háromszor mostuk, majd propidium-jodidot (PI, amely a permeábilis sejtek azonosítására alkalmas vitális színezék) tartalmazó festőpufferben újraszuszpendáltuk, végül FACS-

analízissel vizsgáltuk. Az analízis eredményeként a B305D-protein felületi expresszióját mutattuk ki.

- 5 A fenti leírás alapján szakember számára érthető lesz, hogy - bár a találmányt speciális megvalósítási módjain keresztül szemléltettük - a találmány szerinti megoldásban különféle módosítások hajthatók végre, anélkül, hogy eltérnénk a találmányi gondolat lényegétől. Ilyenformán, ezek a megvalósítási módok nem jelentik a találmány - szabadalmi igénypontokban megfogalmazott - oltalmi körének korlátozását.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Izolált polinukleotid, amely a következő nukleotidszekvenciák bármelyikét tartalmazza:

- 5 (a) 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. vagy 327-330. azonosítószámú szekvenciák;
- (b) az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. vagy 327-330. azonosítószámú szekvenciák komplementer szekvenciái;
- (c) az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. vagy 327-330. azonosítószámú szekvenciák bármelyikének legalább 20 szomszédos nukleotidjából álló szekvenciák;
- (d) az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. vagy 327-330. azonosítószámú szekvenciák bármelyikével mérsékelten sztringens feltételek mellett hibridizálódó szekvenciák;
- 15 (e) az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. vagy 327-330. azonosítószámú szekvenciák bármelyikével legalább 75 %-ban azonos szekvenciák;
- (f) az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. vagy 327-330. azonosítószámú szekvenciák bármelyikével legalább 90 %-ban azonos szekvenciák; vagy
- (g) az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. vagy 327-330. azonosítószámú szekvenciák degenerált változatai.
- 20

2. Izolált polipeptid, amely a következő aminosav-szekvenciák bármelyikét tartalmazza:

- (a) 299., 300., 304-306., 308-312., 314., 326. vagy 331-334. azonosítószámú szekvenciák;
- 25 (b) 1. igénypont szerinti polinukleotid által kódolt szekvenciák;
- (c) 1. igénypont szerinti polinukleotid által kódolt szekvenciával legalább 70 %-ban azonos szekvenciák; vagy
- (d) 1. igénypont szerinti polinukleotid által kódolt szekvenciával legalább 90 %-ban azonos szekvenciák.

30 3. Expressziós vektor, amely expressziós szabályozószekvenciához működőképesen kapcsolva 1. igénypont szerinti polinukleotidot tartalmaz.

4. Gazdasejt, amely 3. igénypont szerinti expressziós vektorral van transzformálva vagy transzfektálva.

5. Izolált antitest vagy antigénkötő fragmense, amely specifikusan kötődik egy 2. igénypont szerinti polipeptidhez.

6. Eljárás rák jelenlétének kimutatására egy páciensben, azzal jellemezve, hogy

(a) a páciensből biológiai mintát veszünk;

5 (b) a biológiai mintát 2. igénypont szerinti polipeptidhez kötődő kötőreagenssel érintkeztetjük;

(c) a mintában kimutatjuk a kötőreagenshez kötődő polipeptid mennyiségét; és

(d) a polipeptid mennyiségét előre meghatározott küszöbértékkel hasonlítjuk össze, s ez alapján megállapítjuk a rák jelenlétét a páciensben.

10 7. Fúziós protein, amely legalább egy 2. igénypont szerinti polipeptidet tartalmaz.

8. Oligonukleotid, amely mérsékelten sztringens feltételek mellett az 1., 3-86., 142-298., 301-303., 307., 313., 314., 316., 317., 325. vagy 327-330. azonosítószámú szekvenciák bármelyikével hibridizál.

15 9. Eljárás tumorproteinre specifikus T-sejtek stimulálására és/vagy szaporítására, azzal jellemezve, hogy a T-sejteket a következő komponensek legalább egyikével érintkeztetjük:

(a) 2. igénypont szerinti polipeptidek;

(b) 1. igénypont szerinti polinukleotidok; és

(c) 2. igénypont szerinti polipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejtek,

20 és az érintkeztetést a T-sejtek stimulálásához és/vagy szaporításához megfelelő feltételek mellett és ideig végezzük.

10. Izolált T-sejt-populáció, amely 9. igénypont szerinti eljárással előállított T-sejteket tartalmaz.

25 11. Készítmény, amely első komponensként fiziológiai szempontból elfogadható hordozót és immunstimulánst, második komponensként pedig a következők bármelyikét tartalmazza:

(a) 2. igénypont szerinti polipeptidek;

(b) 1. igénypont szerinti polinukleotidok;

(c) 5. igénypont szerinti antitestek;

(d) 7. igénypont szerinti fúziós proteinek;

30 (e) 10. igénypont szerinti T-sejt-populációk; vagy

(f) 2. igénypont szerinti polipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejtek.

12. Eljárás immunreakció serkentésére egy páciensben, azzal jellemezve, hogy a páciensnek 11. igénypont szerinti készítményt adunk be.

13. Eljárás rák kezelésére egy páciensben, azzal jellemezve, hogy a páciensnek 11. igénypont szerinti készítményt adunk be.

14. Eljárás rák jelenlétének kimutatására egy páciensben, azzal jellemezve, hogy

(a) a páciensből biológiai mintát veszünk;

(b) a biológiai mintát 8. igénypont szerinti oligonukleotiddal érintkeztetjük;

(c) a mintában kimutatjuk az oligonukleotidhoz hibridizálódott polinukleotid mennyiségét;

(d) az oligonukleotidhoz hibridizálódott polinukleotid mennyiségét előre meghatározott küszöbértékkel hasonlítjuk össze, és ez alapján megállapítjuk a rák jelenlétét a páciensben.

15. Diagnosztikai készlet, amely legalább egy 8. igénypont szerinti oligonukleotidot tartalmaz.

16. Diagnosztikai készlet, amely legalább egy 5. igénypont szerinti antitestet és - reporter csoportot tartalmazó - detektáló reagenst tartalmaz.

17. Eljárás rák kialakulásának gátlására egy páciensben, azzal jellemezve, hogy

(a) egy páciensből izolált, CD4+ és/vagy CD8+ T-sejteket - proliferációjuk elősegítéséhez megfelelő feltételek mellett - a következők közül egy vagy több vegyülettel, illetve sejttel érintkeztetünk:

(i) 2. igénypont szerinti polipeptidek;

(ii) 1. igénypont szerinti polinukleotidok; és

(iii) 2. igénypont szerinti polipeptidet expresszáló antigénprezentáló sejt; és

(b) a páciensnek a proliferálódott T-sejtek hatásos mennyiségét adagoljuk, gátolva ezáltal a páciensben a rák kialakulását.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

dr. Pethő Árpád

szabadalmi ügyvivő

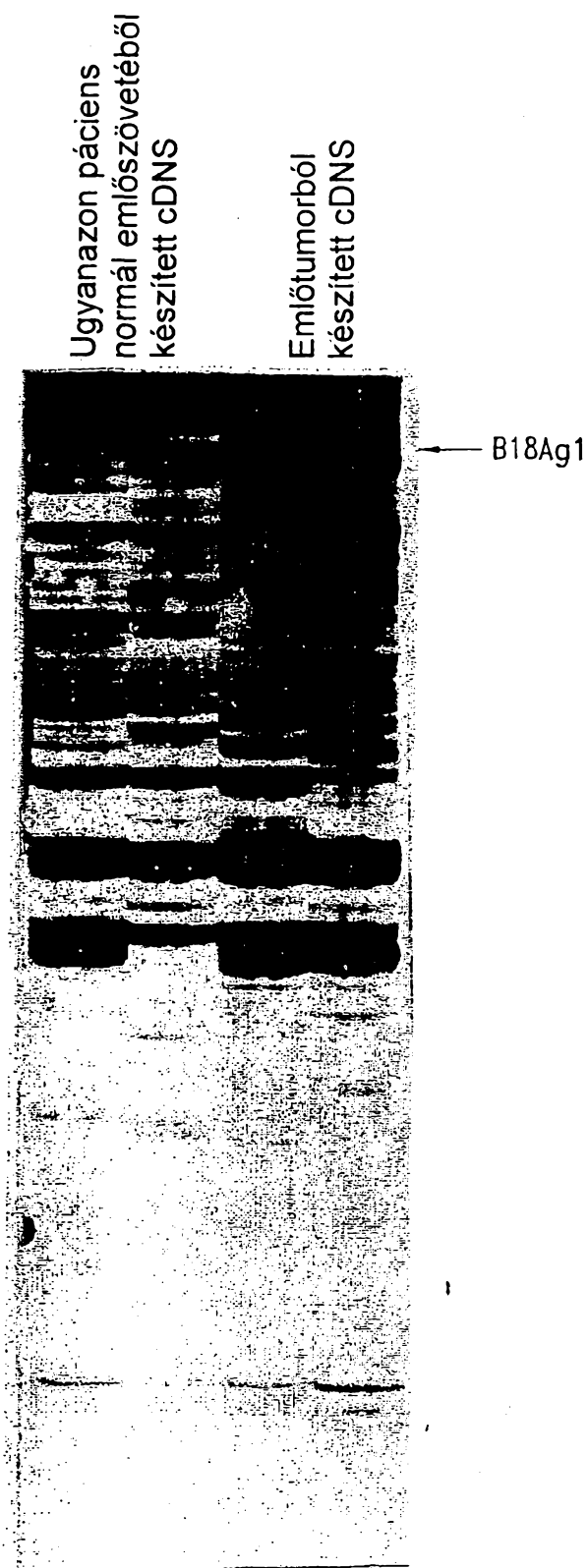
100 oldal leírás

19 oldal rajz

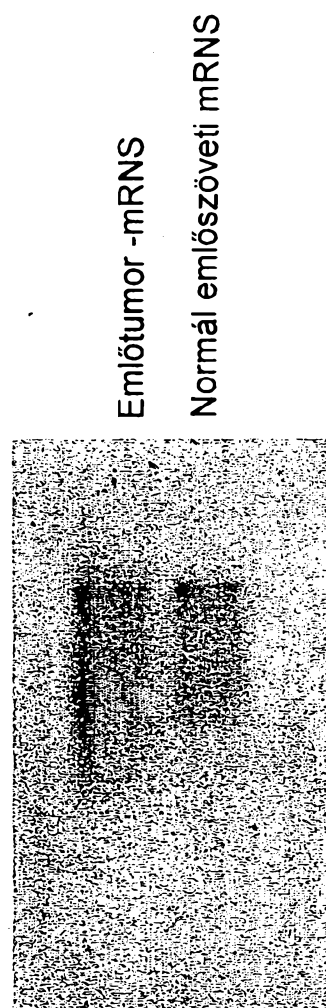
97 oldal rész

216 oldal

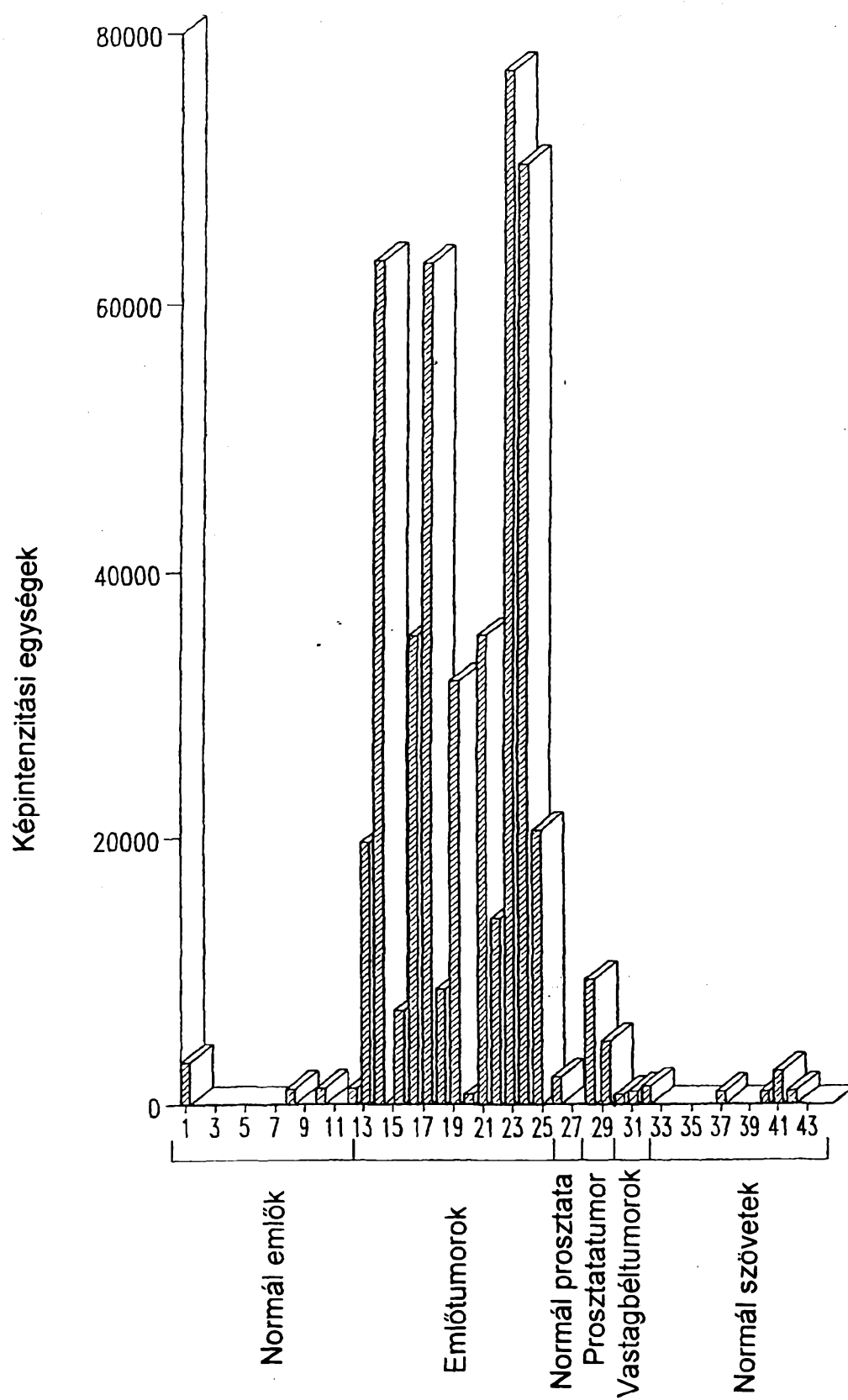
Zoltán H.



1. ábra

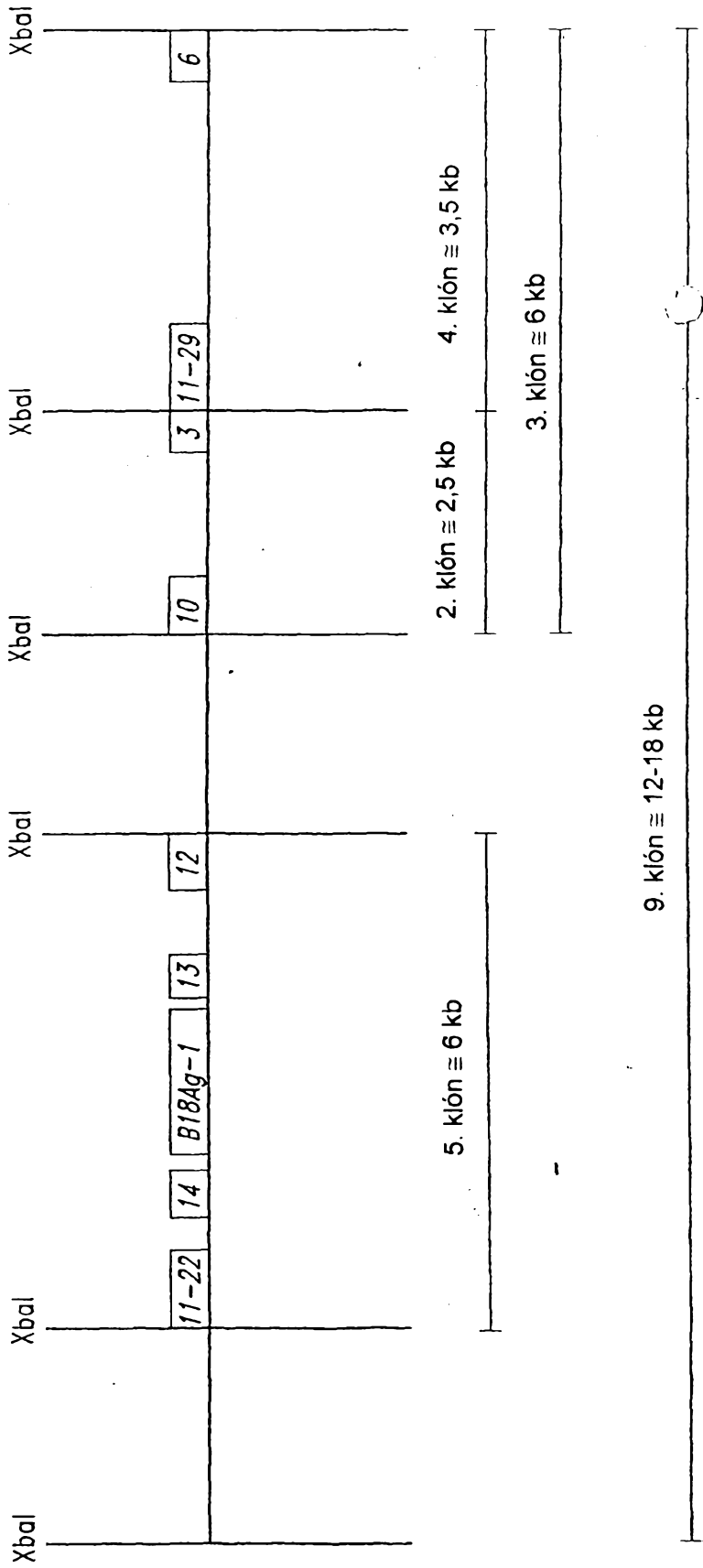


2. ábra

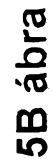


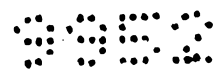
3. ábra

Genomi klóntérkép



4. ábra





TTA GAG ACC CAA TTG GGA CCT AAT TGG GAC CCA AAT TTC TCA AGT GGA 48
Leu Glu Thr Gln Leu Gly Pro Asn Trp Asp Pro Asn Phe Ser Ser Gly
1 5 10 15

GGG AGA ACT TTT GAC GAT TTC CAC CGG TAT CTC CTC GTG GGT ATT CAG 96
Gly Arg Thr Phe Asp Asp Phe His Arg Tyr Leu Leu Val Gly Ile Gln
20 25 30

GGA GCT GCC CAG AAA CCT ATA AAC TTG TCT AAG GCG ATT GAA GTC GTC 144
Gly Ala Ala Gln Lys Pro Ile Asn Leu Ser Lys Ala Ile Glu Val Val
35 40 45

CAG GGG CAT GAT GAG TCA CCA GGA GTG TTT TTA GAG CAC CTC CAG GAG 192
Gln Gly His Asp Glu Ser Pro Gly Val Phe Leu Glu His Leu Gln Glu
50 55 60

GCT TAT CGG ATT TAC ACC CCT TTT GAC CTG GCA GCC CCC GAA AAT AGC 240
Ala Tyr Arg Ile Tyr Thr Pro Phe Asp Leu Ala Ala Pro Glu Asn Ser
65 70 75 80

CAT GCT CTT AAT TTG GCA TTT GTG GCT CAG GCA GCC CCA GAT AGT AAA 288
His Ala Leu Asn Leu Ala Phe Val Ala Gln Ala Ala Pro Asp Ser Lys
85 90 95

AGG AAA CTC CAA AAA CTA GAG GGA TTT TGC TGG AAT GAA TAC CAG TCA 336
Arg Lys Leu Gln Lys Leu Glu Gly Phe Cys Trp Asn Glu Tyr Gln Ser
100 105 110

GCT TTT AGA GAT AGC CTA AAA GGT TTT 363
Ala Phe Arg Asp Ser Leu Lys Gly Phe
115 120

6. ábra

GC TGGGCACAGT GGCTCATACC TGTAATCCTG ACCGTTTCAG AGGCTCAGGT 60

CG CTTGAGCCCA AGATTTCAAG ACTAGTCTGG GTAACATAGT GAGACCCTAT 120

AA AAATAAAAAA ATGAGCCTGG TGTAGTGGCA CACACCAGCT GAGGAGGGAG 180

CT AGGAGA 196

7. ábra

GC TTGGGGGCTC TGA CTAGAAA TTCAAGGAAC CTGGGATTCA AGTCCAAC TG 60
 AC TTACACTGTG GNC TCCAATA AACTGCTTCT TTCTATTCC CTCTCTATTA 120
 AA GGAAAACGAT GTCTGTGTAT AGCCAAGTCA GNTATCCTAA AAGGAGATAC 180
 AT TAAATATCAG AATGTAAAAC CTGGGAACCA GGTCCCAGC CTGGGATTAA 240
 CA AGAAGACTGA ACAGTACTAC TGTGAAAAGC CCGAAGNGGC AATATGTTCA 300
 TT GAAGGATGGC TGGGAGAATG AATGCTCTGT CCCCAGTCC CAAGCTCACT 360
 CT CCTTTATAGC CTAGGAGA 388

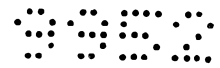
8. ábra

GC CTATAATCAT GTTCTCATT ATTTTCACAT TTTATTAACC AATTTCTGTT 60
 AA AATATGAGGG AAATATATGA AACAGGGAGG CAATGTTTCA ATAATTGATC 120
 TG ATTTCTACAT CAGATGCTCT TTCTTTTCT GTTTATTTCC TTTTATTTC 180
 GG TCGAATGTAA TAGCTTTGTT TCAAGAGAGA GTTTTGGCAG TTTCTGTAGC 240
 CT GCTCATGTCT CCAGGCATCT ATTTGCACTT TAGGAGGTGT CGTGGGAGAC 300
 CT ATTTTTTCCA TATTTGGGCA ACTACTA 337

9. ábra

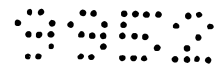
GC CATACAGTGC CTTTCCATTT ATTTAACCCC CACCTGAACG GCATAAACTG 60
GC TGGTGTTTTT TACTGTAAAC AATAAGGAGA CTTTGCTCTT CATTAAACC 120
AT TTCATATTTT ACGCTCGAGG GTTTTTACCG GTTCCTTTTT AACTCCTTA 180
TT TAAGTCGTTT GGAACAAGAT ATTTTTCTT TCCTGGCAGC TTTAACATT 240
TT TGTGCTGGG GGAAGTCTGG TCACTGTTT TCACAGTTGC AAATCAAGGC 300
CC AAGAAAAAAA AATTTTTTTG TTTTATTTGA AACTGGACCG GATAAACGGT 360
CG GCTGCTGTAT ATAGTTTTAA ATGGTTTATT GCACCTCCTT AAGTTGCACT 420
GG GGGGNTTTTG NATAGAAAGT NTTTANTCAG ANAGTCACAG GGAATTTTNT 480
NA CTGAGCTAAA AAGGGCTGNT TTTCGGGTGG GGGCAGATGA AGGCTCACAG 540
TC TCTTAGAGGG GGGAACTNCT A 571

10. ábra



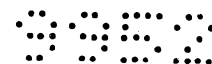
TA ATAACTTAAA TATATTTTGA TCACCCACTG GGGTGATAAG ACAATAGATA 60
TT TCCAAAAAGC ATAAACC AAA AGTATCATA CAAACCAAAT TCATACTGCT 120
CC GCACTGAAAC TTCACCTTCT AACTGTCTAC CTAACCAAAT TCTACCTTC 180
GG TGGTGCTCA CTA CTCTTTT TTTTTTTTT TTTNTTTTGG AGATGGAGTC 240
CA GCCCAGGGGT GGAGTACAAT GGCACAACCT CAGCTCACTG NAACCTCCGC 300
TT CATGAGATTC TCCTGNTTCA GCCTTCCCAG TAGCTGGGAC TACAGGTGTG 360
TG CCTGGNTAAT CTTTTTTNGT TTTNGGGTAG AGATGGGGGT TTTACATGTT 420
TG GTNTEGAACT CCTGACCTCA AGTGATCCAC CCACCTCAGG CTCCCAAAGT 480
TA CAGACATGAG CCACTGNGCC CAGNCCTGGT GCATGCTCAC TTCTCTAGGC 540

11. ábra



TG CACATGCAGA ATATTCTATC GGTACTTCAG CTATTACTCA TTTTGATGGC 60
AG CCTATCCTCA AGATGAGTAT TTAGAAAGAA TTGATTTAGC GATAGACCAA 120
GC ACTCTGACTA CACGAAATTG TTCAGATGTG ATGGATTTAT GACAGTTGAT 180
GA GATTATTAAG TGATTATTTT AAAGGGAATC CATTAATTCC AGAATATCTT 240
TC AAGATGATAT AGAAATAGAA CAGAAAGAGA CTACAAATGA AGATGTATCA 300
TA TTGAAGAGCC TATAGTAGAA AATGAATTAG CTGCATTTAT TAGCCTTACA 360
TT TTCCTGATGA ATCTTATATT CAGCCATCGA CATAGCATT A CCTGATGGGC 420
GA ATAATAGAAA CTGGGTGCGG GGCTATTGAT GAATTCATCC NCAGTAAATT 480
AC AAAATATAAC TCGATTGCAT TTGGATGATG GAATACTAAA TCTGGCAAAA 540
GG AGCTACTAGT AACCTCTCTT TTTGAGATGC AAAATTTTCT TTTAGGGTTT 600
CT ACTTTACGGA TATTGGAGCA TAACGGGA 638

12. ábra



PCT/US01/16776

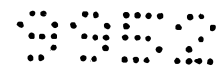
11/19

ACTGATGGAT GTCGCCGGAG GCGAGGGGCC TTATCTGATG CTCGGCTGCC TGTCGTGAT 60
GTGCGCGGCG ATTGGGCTGT TTATCTCAA CACCGCCACG GCGGTGCTGA TGGCGCCTAT 120
TGCCTTAGCG GCGGCGAAGT CAATGGGCGT CTCACCCTAT CCTTTTGCCA TGGTGGTGGC 180
GATGGCGGCT TCGGCGGCGT TTATGACCCC GGTCTCCTCG CCGGTTAACA CCCTGGTGCT 240
TGGCCCTGGC AAGTACTCAT TTAGCGATT TGTCAAAATA GGCCTG 286

13. ábra

AG CAGCCCCCTC TTCTCAATTT CATCTGTAC TACCCTGGTG TAGTATCTCA 60
CA TTTTATAGC CTCCTCCCTG GTCTGTCTTT TGATTTTCT GCCTGTAATC 120
AC ATAAGTGCAA GTAAACATTT CTAAAGTGTG GTTATGCTCA TGCACTCCT 180
AA ATAGTTTCCA TTACCGTCTT AATAAAATTC GGATTTGTTT TTNCTATTN 240
CA CCTATGACCG AA 262

14. ábra

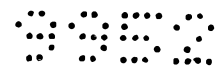


AG CAAAGCCAGT GGTGGAGCT CTCTACTGTG TAAACTCCTA AACCAAGGCC 60
TA AATGGTGGCA GGATTTTAT TATAACATG TACCCATGCA AATTTCTAT 120
GA TATATTCTTC TACATTTAAA CAATAAAAAT AATCTATTTT TAAAAGCCTA 180
AG TTAGGTAAGA GTGTTAATG AGAGGGTATA AGGTATAAAT CACCAGTCAA 240
TG CCTATGACCG A 261

15. ábra

CGACGTCGGT AAAATCGGAC ATGAAGCCAC CGCTGGTCTT TTCGTCCGAG CGATAGGCGC 60
CGGCCAGCCA GCGGAACGGT TGCCCGGATG GCGAAGCGAG CCGGAGTTCT TCGGACTGAG 120
TATGAATCTT GTTGTGAAAA TACTCGCCGC CTCGTTCGA CGACGTCGCG TCGAAATCTT 180
AATCATGGTT GAGCCGGATG CTGCCCCCGA AGCCCT 276

16. ábra

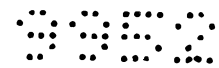


CCCAGGTCAA CCAGGCTGCA ACACGCAGGT CCTTGGATTG GGCACGAAGC AGCGCTTCGC 60
TGTTTTCCAG GATTTTCAAC CAGTCGGTCT GGCCGTTC TC ATGGAGCGAG AGCGCCTTGC 120
CCAGCTCATT TTCCAGCGCC TCGTATTCGC TGGAAAAACG CACATCCTCA CCCGCAAAGA 180
CATCCTTTGA AATCGGCTGT TCCGCGAGTT CCAGATANTG CGAGGAGAGC TTGCTCGAAT 240
AGGTCATCCT AACCTTCAA TGCACACCAT GTGCGCCAAT GAATATCTTA ACAATTCAAC 300
TAGTTGGCAT AANAACCGAA CGAAAATCCC AATAGTCTGA AGAGCTCTTT TG 352

17. ábra

CTGCATGTCC ACGGCTGGA TTACGGGTG GTCGGCGTTC ACCCTGGCA GCTGGCGGCTC 60
TTCCCGACCA GGCCAGCAG GATGTGTGGG GCAAGGATAA CGGCGTGGC ATCGCCTCGA 120
CCTATATGCC TACTGGCAAG GCCGAGCCCG TGGAAAGCGG ATTCAGGTTC ANCGGTCGT 180
GGAGCTTTTC CACCGGCTCC ATGCATTGTG ACTGGCTGTT TCTAGGCGGT CTGTTGCCCA 240
AGCGTGATGG TACGTCTGGC CTGGAGCATG TGACTTTCTG 280

18. ábra

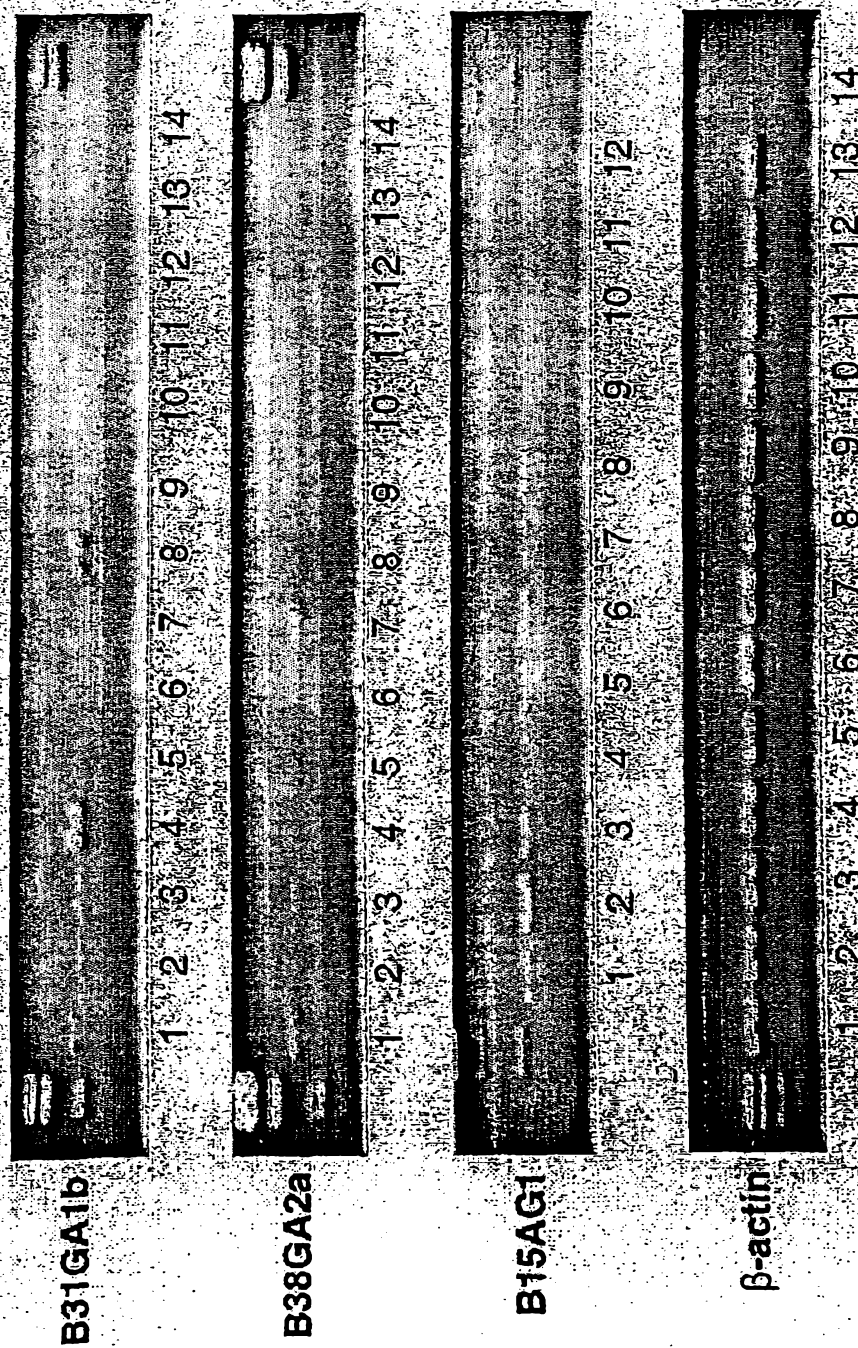


AG GGAGCAAGGA GAAGGCATGG AGAGGCTCAN GCTGGTCCTG GCCTACGACT 60
CT GTCGCCGGGG ATGGTGGAGA ACTGAAGCGG GACCTCCTCG AGGTCTCTCG 120
TC NCCGTCCAGG AGGAGGGTCT TTCCGTGGTC TNGGAGGAGC GGGGGGAGAA 180
TC ATGGTCNACA TCCC 204

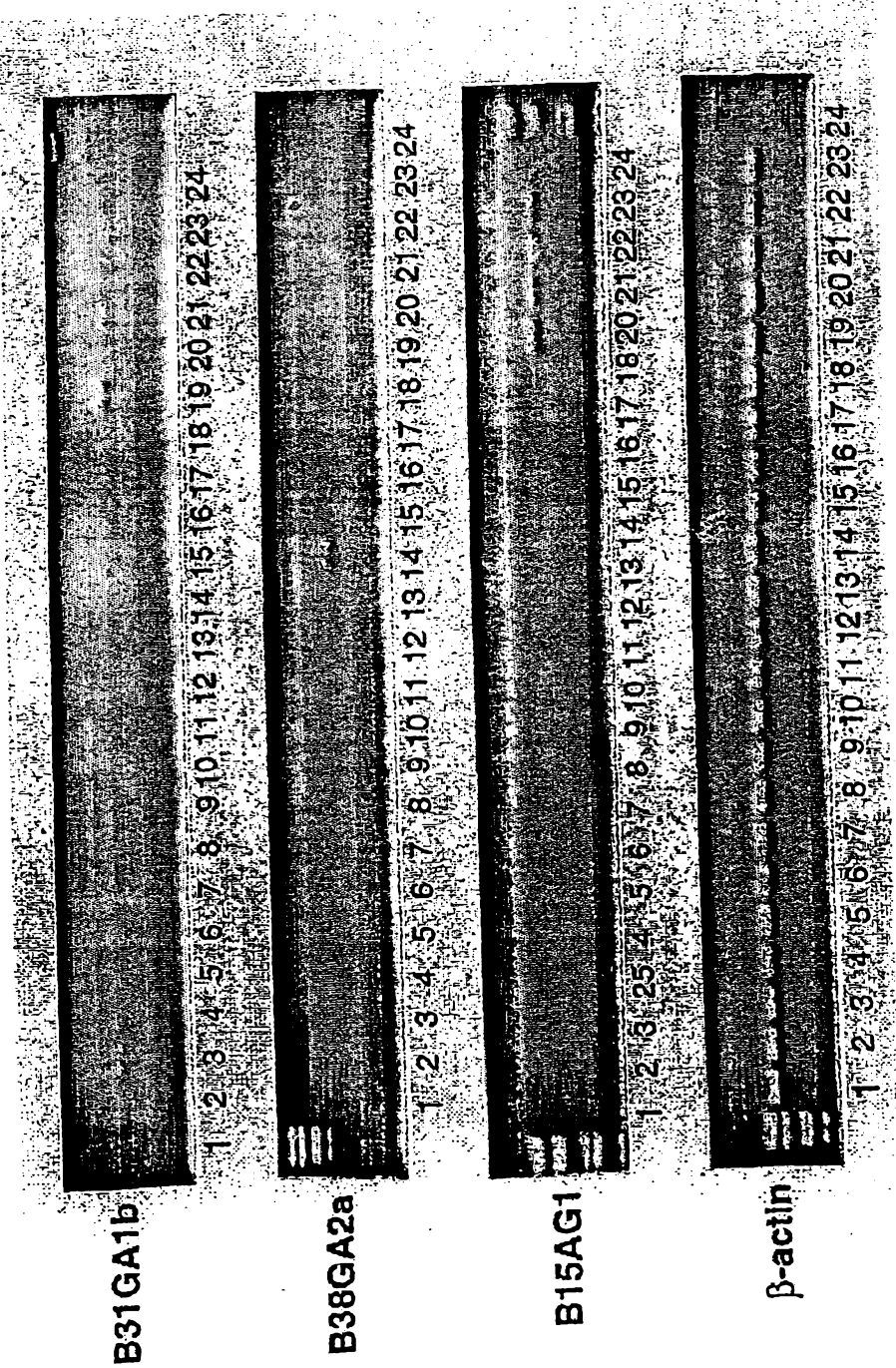
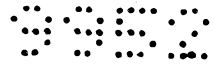
19. ábra

TC AGGAGCGGGT AGAGTGGCAC CATTGAGGGG ATATTCAAAA ATATTATTTT 60
TG ATAGTTGCTG AGTTTTTCTT TGACCCATGA GTTATATTGG AGTTTATTTT 120
CC AATCGCATGG ACATGTTAGA CTTATTTTCT GTTAATGATT NCTATTTTAA 180
GA TTTGAGAAAT TGGTTNTTAT TATATCAATT TTTGGTATTT GTTGAGTTTG 240
GC TTAGTATGTG ACCA 264

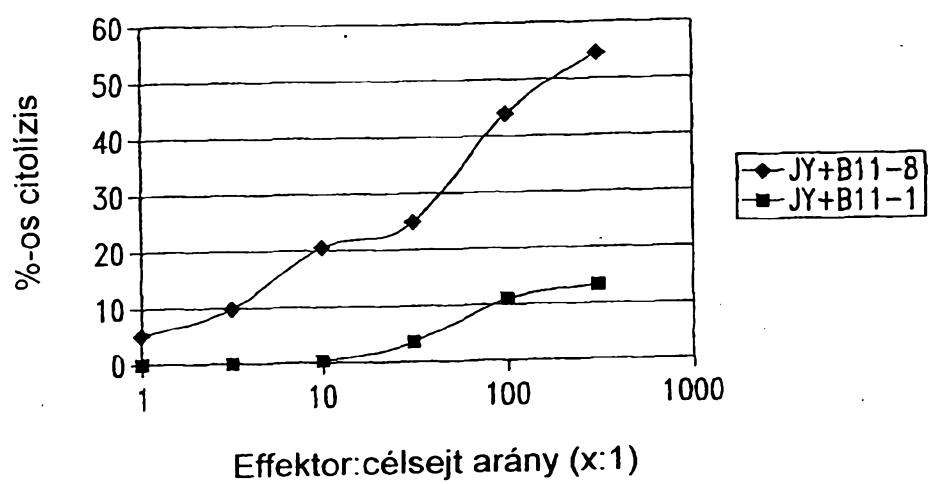
20. ábra



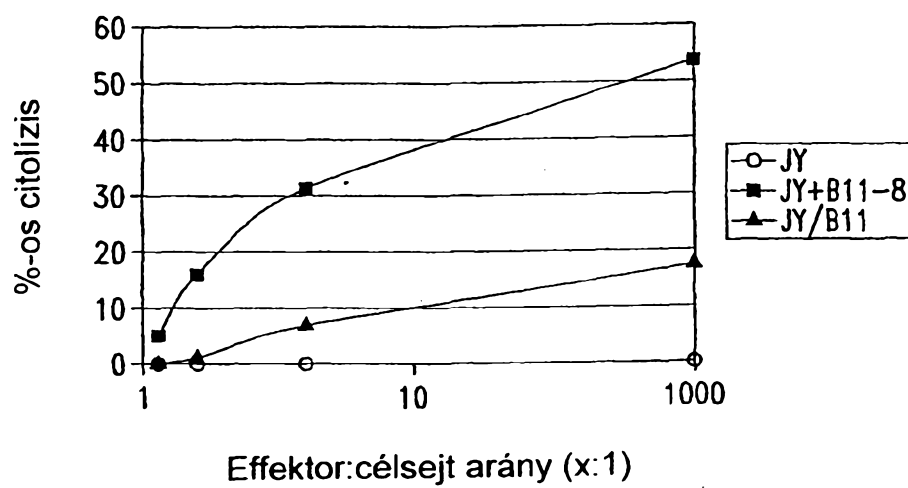
21A ábra



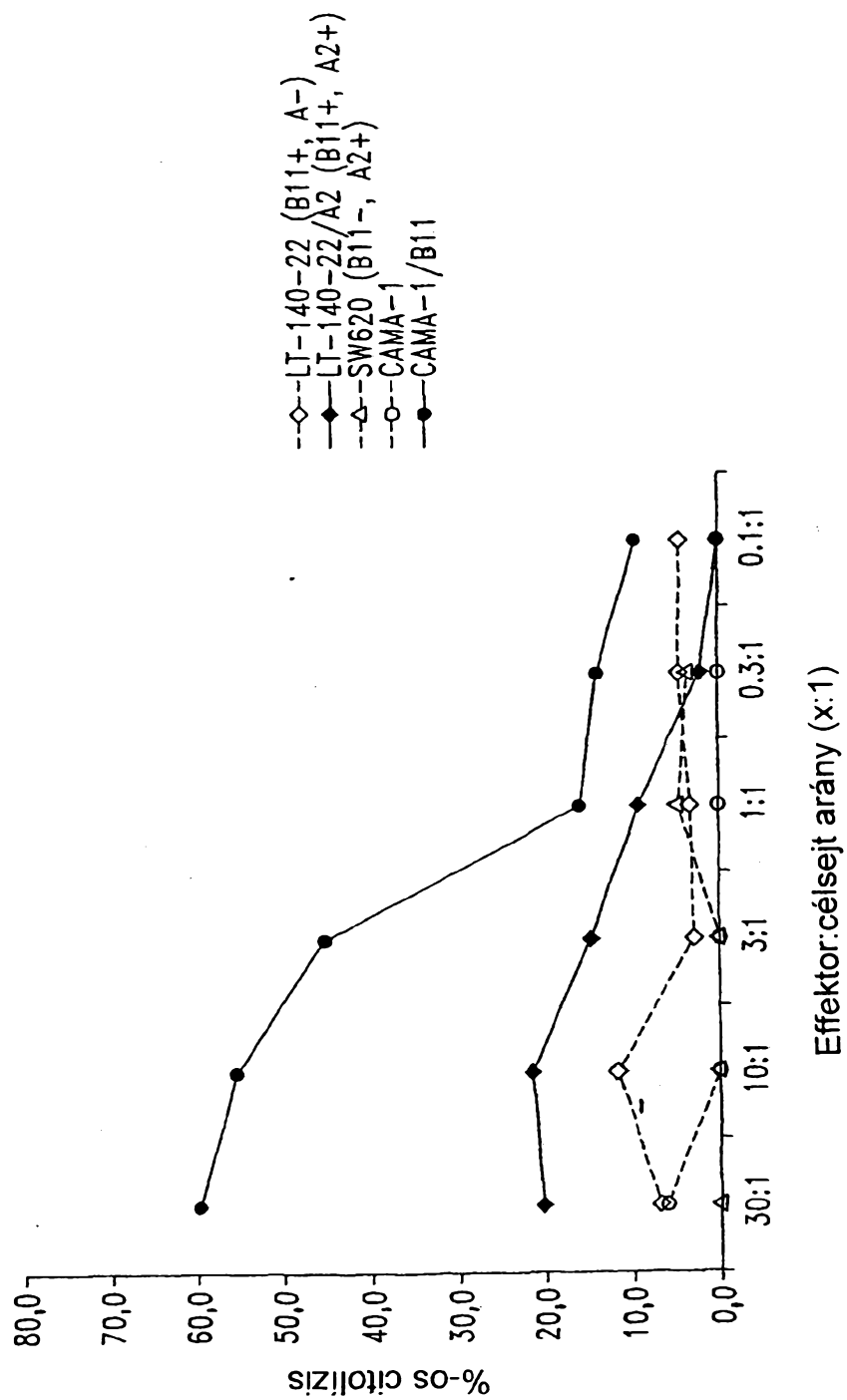
21B ábra



22. ábra



23. ábra



24. ábra