



(19) Országkód

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**218 598 B**

(21) A bejelentés ügyszám: P 93 02066  
(22) A bejelentés napja: 1992. 01. 15.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
07/641,347 1991. 01. 16. US  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 92/00066  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/12725

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

**A 61 K 38/20**

C 12 N 15/24

(40) A közzététel napja: 1995. 09. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 2000. 10. 30.

(72) Feltalálók:

Moore, Kevin W., Palo Alto, Kalifornia (US)  
Vieira, Paulo J. M., Mountain View,  
Kalifornia (US)

(73) Szabadalmaz:

Schering Corp., Kenilworth, New Jersey (US)

(74) Képviselő:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi  
Iroda, Budapest

(54) **Eljárás interleukin-10-et tartalmazó, tumorok kezelésére szolgáló  
gyógyszerkészítmények előállítására**

### **KIVONAT**

A találmány tárgya eljárás rákos betegségek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására, amelyekben hatóanyagként interleukin-10-et (IL-10-et) alkalmaznak hatóanyagként a tumorok növekedésének csökkentésére, illetve kifejlődésük megelőzésére. A ha-

tóanyagként alkalmazott IL-10-aktivitású polipeptidok géntechnológiai eljárásokkal – megfelelő expreziós vektorok kifejlesztése révén és alkalmas gazdaszervezet-vektor kombinációk alkalmazásával – állíthatók elő.

A találmány általánosságban embereknel daganatos vagy rákos betegségek kezelésére szolgáló, hatóanyagként interleukin-10-et (IL-10) tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására vonatkozik.

A rák kezelésének immunológiai megoldása azon az elgondoláson alapul, hogy a ráksejtek valamilyen módon kikerülnek a szervezet védekezőmechanizmusát, mely az abnormális és idegen sejtek és molekulák ellen irányul, és hogy ez a védekezőképesség terápiásan stimulálható ezen veszített terep visszaszerzése érdekében [Klein: Immunology, 623-648. oldal, Wiley-Interscience, New York (1982)]. A legújabb megfigyelések, miszerint a különböző immuneffektorok közvetlenül vagy közvetve gátolják a tumorok növekedését, megújuló érdeklődést váltottak ki a rákterápiának ilyen módon való megoldása iránt [lásd például: Herberman, Concepts Immunopathol. 1, 96-132, 1985 (a természetes ölüssejtek akadályozzák a tumorsejtek növekedését); Rosenberg et al., Ann. Rev. Immunol., 4, 681-709, 1988 (IL-2-vel aktivált ölüssejtek klinikai felhasználása rák kezelésére); Ralph et al., J. Exp. Med., 167, 712-717, 1988 (limfokinekkal stimulált makrofágok tumorcidaktivitása); Tepper et al., Cell, 57, 503-512, 1989 (az IL-4 antitumoraktivitással rendelkezik); S. Cohen (szerk.) Lymphokines and the Immune Response (CRC Press, Boca Raton, 1990) című kiadványban M. Cohen, „Lymphokines and Tumor Immunity”, 237-253. oldal és így tovább].

A találmány tárgyát képezi az interleukin-10-et tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására szolgáló eljárás. Előnyös, ha a hatóanyagként alkalmazott interleukin-10-et olyan érett polipeptidek csoportjából választjuk ki, melyek nyílt leolvasási kereteit az 1. és 2. számú szekvenciavázlatban megadott aminosavszekvenciák határozzák meg. A szekvenciavázlatokban a hárombetűs rövidítések L-aminosavakat jelentenek, és a szekvenciák az N-terminális végnél kezdődnek. Az IL-10 fent említett két formáját humán IL-10-nek (hIL-10 vagy humancitokinszintézis-gátló faktor; CSIF=human cytokine synthesis inhibitory factor), illetve virális IL-10-nek (vIL-10 vagy BCRF1) nevezik. [Például: Moore et al., Science, 248, 1230-1234 (1990); Vieira et al., Science, 88, 1172-1176 (1991); Fiorentino et al., J. Exp. Med., 170, 2081-2095 (1989); Hsu et al., Science, 250, 830-832 (1990)]. Még előnyösebb, ha a találmány szerinti eljárásban használt érett IL-10-et az olyan érett polipeptidek közül választjuk ki, melyek nyílt leolvasási keretét a 3. és a 4. számú szekvenciavázlatban megadott aminosavszekvenciák határozzák meg.

Az alábbiakban az ábrák rövid ismertetése következik.

Az 1. ábrán a pcD(SR $\alpha$ ) emlős-expressziósvektor vázlatos rajza látható.

A 2. ábrán a TRP-C11 bakteriális expressziós vektor vázlatos rajza látható.

A 3. ábra a pGSRG plazmidot mutatja be, amelynek XhoI restrikciós helyénél az egér-IL-10, virális IL-10 vagy humán IL-10 van beépítve. Az ábra a végső szerkezet

(neve: TAC-RBS) RBS-ATG-polilinker szakaszának szekvenciáját is bemutatja.

A találmány tárgya olyan gyógyszerkészítmény előállítása, amelyben az IL-10-et használjuk a rákos daganatok növekedésének a megelőzésére és/vagy csökkentésére. A találmány kivitelezésében felhasznált IL-10-et azon érett polipeptidek csoportjából választjuk ki, amelyeket a pH5C, pH15C és a pBCRF1(SR $\alpha$ ) cDNS-inszertumai által meghatározott nyílt leolvasási keretek kódolnak. Az említett cDNS-inszertumokat az American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA) intézményben 68191, 68192, illetve 68193 letéti szám alatt helyeztük letétbe.

A találmány szerinti gyógyszerkészítményekben alkalmazható polipeptidek előállíthatók számos egysejtű és többsejtű expressziós rendszerben (gazdasejt-expressziós vektor kombinációk). A lehetséges gazdasejt-típusok közé tartoznak – de nem kizárólag – a bakteriális, élesztő-, rovar-, emlőssejtek és hasonlóak. Számos referátum nyújt útmutatást a specifikus expressziós rendszerek kiválasztásához és/vagy módosításához. Például – hogy néhányat említsünk – de Boer és Shepard: „Strategies for Optimizing Foreign Gene Expression in Escherichia coli” című fejezet (205-247. oldal) a Genes: Structure and Expression című kiadványban (szerk.: Kroon, kiadó: John Wiley and Sons, New York, 1983), amely több E. coli expressziós rendszert tekint át: Kuchlerlapati és munkatársai, Critical Reviews in Biochemistry, 16, 349-379 (1984) és Banerji és munkatársai, Genetic Engineering, 5, 19-31 (1983) az emlőssejtek transzfektálásának és transzformálásának módszereit foglalják össze; Reznikoff és Gold (szerk.): Maximizing Gene Expression (Butterworths, Boston, USA, 1986) című kiadványa az E. coli-ban, élesztőben és emlőssejtekben megvalósuló génexpresszióról szóló közlésekből válogat; és Thilly: Mammalian Cell Technology (Butterworths, Boston, 1986) az emlős-expressziósrendszereket tekinti át. Ugyanígy, igen sok olyan összefoglaló munka áll rendelkezésre, amelyek specifikus cDNS-ek és expressziót szabályozó szekvenciák összekapcsolására és/vagy manipulálására szolgáló technikákat és feltételeket írnak le. Ezek a találmány szerinti expressziós vektorok előállítására és/vagy módosítására is használhatók (például: Sambrook et al., lásd fentebb).

Egy E. coli expressziós rendszert ismertet Riggs a 4,431,739 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, amely ebben a leírásban referenciaként szerepel. E. coli-ban a magas szintű expresszióra különösen jól használható prokariótapromoter a tac promoter, melyet de Boer írt le a 4,551,433 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, és amelyet itt ugyancsak referenciaként említsünk. Szekréciós expressziós vektorokkal is rendelkezünk E. coli gazdasejtek számára. Különösen jól használhatók a pIN-III-ompA vektorok [Ghrayeb et al., EMBO J., 3, 2437-2442 (1984)], melyekben az átírandó cDNS-t az ompA protein szignálpeptidjét kódoló E. coli OmpA gén egy részéhez fuzionálják, és ennek következtében az érett protein a baktériumok periplazmatikus terébe szekretálódik.

A 4,336,336 és a 4,338,397 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások szintén ismertetnek szekréción expressziós vektorokat prokarióták számára. Az említett leírásokat is referenciaként tekintjük.

Számos baktériumtörzs alkalmas prokarióta-expressziósvektorok számára. Ilyenek a következő *E. coli* törzsek: W3110 AATCC No. 27325), JA221, C600, ED767, DH1, LE392, HB101, X1776 (ATCC No. 31244), X2282, RR1 (ATCC No. 31343), MRCI, továbbá a *Bacillus subtilis* és más enterobacteriaceae fajok, így a *Salmonella typhimurium* vagy a *Serratia marcescens* és számos *Pseudomonas* faj. Baktériumtörzsek módosítására szolgáló általános módszereket ír le Curtis a 4,190,495 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, amely az eukariótaproteinek expressziójához használatos *E. coli* K12 X1776 törzset is ismerteti. Ezt a szabadalmi leírást szintén referenciaként tekintjük.

A prokarióta- és eukariótamikroorganizmusokon kívül többsejtű szervezetekből származó sejteket tartalmazó expressziós rendszerek is használhatók a találmány szerinti proteinek termelésére. Különösen jelentősek az emlős-expressziósrendszerek, mivel ezekben nagyobb a valószínűsége annak, hogy a transzlációt követő feldolgozómechanizmusok biológiailag aktív emlőspoteineket termelnek. Számos DNS-tumor-vírust használtak vektorként emlősgazdasejtekben. Különösen fontos sok olyan vektor, melyek SV40 replikációs, transzkripciós és/vagy transzlációs szabályozószekvenciákat tartalmaznak bakteriális replikációs szabályozószekvenciákkal összekapcsolva, ilyenek például az Okayama és Berg [Mol. Cell. Biol., 2, 161–170 (1982) és Mol. Cell. Biol., 3, 280–289 (1983)] által kifejlesztett és Takebe és munkatársai [Mol. Cell. Biol., 8, 466–472 (1988)] által tökéletesített pcD vektorok. Az említett közlemények ebben a leírásban referenciaként szerepelnek. Más SV40-alapú emlős-expressziósvektorokat ismertet Kaufman és Sharp [Mol. Cell. Biol., 2, 1304–1319 (1982)] és Clark és munkatársai a 4,465,285 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban. Az említett leírásokat referenciaként használjuk. A fenti vektorok számára rendszerint a majomsejtek az előnyös gazdasejtek. SV40 ori szekvenciákat és ép A gént tartalmazó vektorok autonóm módon képesek replikálódni majomsejtekben (nagyobb másolatszámú és/vagy stabilabb másolatszámú replikálódnak, mint a nem autonóm módon replikálódó plazmidok). Ezenfelül az SV40 ori szekvenciákat ép A gén nélkül tartalmazó vektorok is autonóm módon tudnak replikálódni nagy másolatszámú (de nem stabilan) COS7 majomsejtekben Gluzman leírása szerint [Cell, 23, 175–182 (1981)]. A COS7 sejtek az ATCC-től beszerezhetők (letéti szám: ATCC CRL 1651). A fenti SV40-alapú vektorok más emlőssejteket – ilyenek az egér-L-sejtek – is képesek transzformálni azáltal, hogy a gazdasejt DNS-ébe integrálódnak.

A találmány szerinti gyógyszerkészítményekben alkalmazható polipeptidok termelésére többsejtű szervezetek is alkalmazhatók gazdasejtként, így például a rovarlárvák sejtjei [Maeda et al., Nature, 315, 592–594

(1985) és Ann. Rev. Entomol., 351–372 (1989)] és a transzgenikus állatok sejtjei [Jaenisch, Science, 240, 1468–1474 (1988)].

#### *I. Interleukin-10-meghatározási módszerek*

Az IL-10 polipeptidok számos olyan biológiai aktivitást fejtenek ki, amelyek alapján meghatározhatók, és az egység definiálható. Részletesebben kifejtve: az IL-10-ek képesek meggátolni legalább egy citokin szintézisét az IFN- $\gamma$ -t, limfotoxint, IL-2-t, IL-3-at és GM-CSF-et magában foglaló csoportból egy olyan T-helpersejt-populációban, mely egy vagy több ilyen citokin szintézisére indukálódott azáltal, hogy szingénikus antigénbemutató sejtek (APC=antigen-presenting cell) és antigén hatásának vannak kitéve. Ez esetben az antigénbemutató sejteket olyan módon kezeljük, hogy a sejtek legyenek képesek replikálódni, de antigénfeldolgozó mechanizmusuk működőképes maradjon. Ezt egyszerűen úgy érjük el, hogy az antigénbemutató sejteket körülbelül 1500–3000 R dózissal (gamma- vagy röntgenbesugárzás) besugározzuk, mielőtt a T-sejtekkel összekevernénk.

Más módon a citokingátlást első vagy előnyösebben második kevertlimfocita-reakciókban (MLR=mixed-lymphocyte reaction) vizsgálhatjuk, és ebben az esetben nem szükséges szingénikus APC-ket használni. A szakterületen jól ismertek az MLR-ek [például a „Selected Methods in Cellular Immunology” (szerk.: Mishell et al., Freeman, San Francisco, 1980) című kiadványban Bradley közleménye (162–166. oldal); és Battisto et al., Meth. in Enzymol., 150, 83–91 (1987)]. Röviden kifejtve: allogén limfoid sejtek két populációját keverjük össze, az egyik populációt a keverés előtt a proliferáció megakadályozása céljából például besugárással kezeljük. A sejtpopulációkat előnyösen így készítjük, hogy a kiegészített táptalajban, például a 10% fetális borjúsérummal (FS) kiegészített RPMI táptalajban koncentrációjuk körülbelül  $2 \times 10^6$  sejt/ml legyen. A meghatározásban mind a kontroll-, mind a tesztkulturák készítéséhez mindegyik populációból 0,5 ml-t keverünk össze. A második MLR-ben az első MLR-ben 7 napig tartott sejteket ezután újból stimuláljuk frissen készített, besugárzott stimulátorsejtekkel. A mintát, amelyről gyanítjuk, hogy IL-10-et tartalmaz, a keveréskor adhatjuk a tesztkulturákhoz, majd 1–3 nappal a keverés után mind a kontroll-, mind a teszttenyészeteket citokintermelésre vizsgáljuk.

Az IL-10-meghatározáshoz szükséges T-sejt-populációkat és/vagy APC-populációkat jól ismert technikákkal állítjuk elő. Ezeket a technikákat pontosan ismertetik DiSabato és munkatársai [Meth. in Enzymol., 108 (1984)]. Az IL-10 vizsgálatoknál előnyben részesített APC-k a perifériás vérmonociták. Ezeket standard technikák használatával nyerjük [Lásd: Boyum, Meth. in Enzymol., 108, 88–102 (1984); Mage, Meth. in Enzymol., 108, 298–302 (1984); Stevenson, Meth. in Enzymol., 108, 242–249 (1984); és Romain et al., Meth. in Enzymol., 108, 148–153 (1984)]. Az említett közlemények ebben a leírásban referenciaként szerepelnek. Előnyös, ha az IL-10-meghatározásokhoz helper T-sejteket használunk. Ezeket úgy nyerjük, hogy először a

perifériás vérből elkülönítjük a limfocitákat, azután szektáljuk a helpersejteket panning vagy folyadékcitometria segítségével, kereskedelemben kapható anti-CD4 antitest használatával, például a 4,381,295 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett OKT4-gyel (beszerezhető az Ortho Pharmaceutical Corporationtól). [A szükséges technikák leírását lásd: Boyum, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21, (Suppl. 97), 77 (1968) és *Meth. in Enzymol.*, 108, (lásd fent) és Braun et al., *Meth. in Enzymol.*, 121, 737–748 (1986)]. A PBL (peripheral blood lymphocyte)-sejtek általában friss vérből nyerhetők Ficoll-Hypaque sűrűséggradiens-centrifugálással.

A vizsgálatban többféle antigén alkalmazható, így például a csigahemocianin (keyhole limpet hemocyanin=KLH), a szárnyas  $\gamma$ -globulin vagy hasonlók. Előnyösebb, ha a vizsgálatban a helper T-sejteket antigén helyett anti-CD3 monoklonális antitesttel, például OKT3-mal (lásd a 4,361,549 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást) stimuláljuk.

A kontroll- és tesztmintákban a citokinkoncentrációkat standard biológiai és/vagy immunkémiai módszerekkel mérjük. A szakterületen – ha rendelkezésre áll tisztított citokin – jól ismertek a specifikus citokinek immunkémiai vizsgálatára szolgáló eljárások. [A tárgyban bőséges irodalom áll rendelkezésre. Például: Campbell: „Monoclonal Antibody Technology” (Elsevier, Amsterdam, 1984); Tijssen: „Practice and Theory of Enzyme Immunoassays” (Elsevier, Amsterdam, 1985); 4,486,530 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás]. Humán IL–2, humán IL–3 és humán GM–CSF ELISA kiték a Genzyme Corporationtól (Boston, MA, USA) beszerezhetők; humán IFN- $\gamma$  ELISA kit az Endogen Inc., (Boston, MA, USA) cégtől vásárolható. Humán limfotoxin specifikus poliklonális antitesteket a Genzyme Corp. forgalmaz, amelyeket a humán limfotoxin radioimmunoassay-ben használhatunk (például: Chard: „An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques” (Elsevier, Amsterdam, 1982)).

A citokinek fent felsorolt biológiai vizsgáló módszereit az IL–10-aktivitás meghatározására is fel lehet használni. Humán limfotoxin biológiai vizsgálatokat ismertetnek a következő közlemények: Aggarwal, *Meth. in Enzymol.*, 116, 441–447 (1985) és a „Lymphokines and Interferons: A Practical Approach” (szerk.: Clemens et al., IRL Press, Washington, D. C., 1987) című kiadványban Matthews és munkatársai írása (221–225 oldal). A humán IL–2-t és a GM–CSF-et a CTLL–2 és KG–1 (beszerezhetők az ATCC-től TIB 214, illetve CCL 246 letéti számon) faktordependens sejtvonalakkal vizsgálhatjuk. A humán IL–3 vizsgálata annak alapján történik, hogy számos hematopoietikus sejttelép képződését képes stimulálni lágyagartenyészetekben [például Metcalf: „The Hemopoietic Colony Stimulating Factors” (Elsevier, Amsterdam, 1984)]. Az IFN- $\gamma$  antivirális vizsgálatokkal mérhető [például Clemens et al. szerkesztésében (lásd fentebb) Meager közleménye, 129–147 oldal].

A citokintermelés mRNS-analízissel is kimutatható. A citokin-mRNS-eket White és munkatársai

[*J. Biol. Chem.*, 257, 8569–8572 (1982)] és Gillespie és munkatársai (4,483,920 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás) által leírt citoplazma dot hibridizációval mérhetjük. A közölt módszert leírásunkban referenciaként tekintjük. Más megoldásokban dot blotting szerepel tisztított RNS használatával [például: Hames et al., (szerk.) „Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach” (IRL Press, Washington, D. C., 1985)].

10 Bizonyos esetekben az IL–10-re vizsgálandó mintáknak előkezelést kell kapniuk az előre meghatározott citokinek eltávolítása céljából, amelyek zavarhatják a vizsgálatot. Bizonyos sejtekben például az IL–2 növeli az IFN- $\gamma$ -termelést, tehát a vizsgálatban használt helper T-sejtektől függően az IL–2-t esetleg el kell távolítani a vizsgálandó mintából. Az eltávolítást könnyen kivitelezhetjük, ha a mintát anticitokinaffinitás-oszlopon engedjük át. Az IL–10-aktivitás egységét az IL–10 azon képességével fejezzük ki, hogy mennyire tudja növelni az MC/9 sejtek IL–4 indukálta proliferációját. (Az MC/9 sejteket a 4,559,310 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás ismerteti; beszerezhetők az ATCC-től CRL 8306 letéti számon). 1 egység/ml az IL–10 azon koncentrációja, amellyel az MC/9 sejtproliferáció maximális stimulációjának 50%-a érhető el az IL–4 szintje felett a következő vizsgálatban. Standard mikrotitrálólemezen, tartályonként 50  $\mu$ l táptalajban az IL–4 és IL–10 kétszeres és háromszoros hígításait készítjük el; a táptalaj RPMI 1640, kiegészítve 10% fétális borjuszérummal, 50  $\mu$ M 3-merkaptó-etanolal, 2-mM glutaminnal, 100 E/l penicillinnel és 100  $\mu$ g/l sztreptomocinnal. Táptalajjal hígított IL–4-ből (1600 E/ml) 25  $\mu$ l-t mérünk be tartályonként (végső koncentráció: 400 E/ml), és a lemezt egy éjszakán át – például 20–24 órán át – inkubáljuk.  $^3$ H-timidinből (például 50  $\mu$ Ci/ml táptalaj) tartályonként 0,5–1,0  $\mu$ Ci-t mérünk be, és a sejteket újból egy éjszakán át inkubáljuk; ezután a sejteket learatjuk, és mérjük a beépült radioaktivitást.

## 40 II. Tisztítás és gyógyszerkészítmények

Abban az esetben, ha a találmány szerinti polipeptidek oldott formában fejeződnek ki, például mint a transzformált élesztő- vagy emlőssejtek szekretált termékei, akkor a szakterület standard eljárásai szerint végezhetjük el tisztításukat. Ezek az eljárások a következő lépéseket tartalmazhatják: ammónium-szulfátos kicsapás, ioncserés kromatográfia, géliszűrés, elektroforézis, affinitáskromatográfia és/vagy hasonlók. [Például a következő kiadványok tartalmazzák útmutatást az ilyen tisztítási eljárásokhoz: „Enzyme Purification and Related Techniques”, *Methods in Enzymology*, 22, 233–577 (1977) és R. Scopes: „Protein Purification: Principles and Practice” (Springer-Verlag, New York, 1982)]. Abban az esetben, ha a találmány szerinti polipeptidek oldatlan formában – például mint aggregátumok, zárványtestek vagy hasonlók – fejeződnek ki; ezeket olyan standard eljárásokkal tisztíthatjuk, melyek a következő lépéseket tartalmazzák: a roncsolt sejtektől centrifugálással választjuk el a zárványtesteket, majd kaotrop szerekekkel és redukálószerekkel old-

juk a zárványtesteket. Az oldott elegyet hígítjuk, és annyira csökkentjük a kaotrop szer és redukálószer koncentrációját, hogy a polipeptid biológiailag aktív konformációt vegyen fel. Ez utóbbi eljárások ismertetését tartalmazzák az alábbi közlemények, illetve szabadalmi leírások: Winkler és munkatársai, *Biochemistry*, 25, 4041–4045 (1986), Winkler és munkatársai, *Biotechnology*, 3, 992–998 (1985); Koths és munkatársai: 4,569,790 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; és a 86306917.5 és 86306353.3 számú nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentések. Az említett leírásokat referenciaként tekintjük.

Az általunk használt „hatékony mennyiség” kifejezés olyan mennyiséget jelent, amely elégséges a tumor növekedésének csökkentéséhez vagy megelőzéséhez. Egy adott betegnél a hatékony mennyiség a következő faktoroktól függ: a kezelendő daganatos betegség fokozatától és típusától, a beteg általános egészségi állapotától, a beadás módjától, a mellékhatások súlyosságától és hasonlótól. Általában az IL–10-et olyan gyógyszerkészítmény formájában alkalmazzuk, amely az IL–10 hatékony mennyiségét, valamint valamilyen, a gyógyszergyártásban szokásosan használatos vivőanyagot tartalmaz. Gyógyszervivőanyag lehet bármilyen kompatibilis, nem toxikus anyag, mely alkalmassá teszi a találmány szerinti készítményeket a betegnek való beadásra. Az ilyen gyógyszerek parenterális beviteléhez alkalmas készítmények általában jól ismertek [például: Remington's Pharmaceutical Science, 15. kiadás (Mack Publishing Company, Easton, PA (1980))]. A találmány szerinti készítményeket beültethető vagy injektálható gyógyszerleadó rendszerek segítségével is bejuttathatjuk a beteg szervezetébe [például: Urquhart et al., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 24, 1990–236 (1984); Lewis: „Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals” (Plenum Press, New York (1981); 3,773,919 számú és 3,270,960 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások; és hasonló].

Parenterális alkalmazás esetén az IL–10-et egyadagos injekció formában formázzuk (oldat, szuszpenzió, emulzió) egy gyógyszergyártásban szokásos vivőanyaggal. Ilyen vivőanyag lehet az izotóniás konyhasóoldat, a Ringer-oldat, glükózoldat és a Hank-oldat. Nemvizes vivőanyagokat is használhatunk, ezek közé tartoznak stabilizált olajok és az etil-oleát. Előnyös vivőanyag az 5%-os glükóz/konyhasó oldat. A vivőanyag kis mennyiségű olyan adalékanyagokat tartalmazhat, amelyek biztosítják az izotonicitást és a kémiai stabilitást. Ilyenek például a pufferek és a konzerválószer. Az IL–10-et előnyösen tisztított formában, lényegében aggregátumoktól és más proteinektől mentes állapotban formázzuk, körülbelül 5–20 µg/ml koncentrációhatárok között. Előnyös, ha az IL–10-et folyamatos infúzióban alkalmazzuk úgy, hogy a naponta beadott mennyiség körülbelül 50–8000 µg között legyen (azaz körülbelül 1–16 µg/kg/nap). A napi infúzió mennyiségének változtatása a mellékhatások és a véresejtszámok figyelésén alapul.

Az alábbi példák a találmány jellemzőinek szemléltetésül szolgálnak. A kiválasztott vektorokat, gazdasejteket, a reagensek koncentrációját, a hőmérsékleteket, valamint az egyéb változók értékeit a találmányban csupán szemléltető példaként szerepeltetjük, ezekkel nem óhajtjuk korlátozni a találmány oltalmi körét.

#### 1. példa

##### *Humán CSIF kifejezése bakteriális gazdasejtben*

(CSIF=cytokine synthesis inhibitory factor=citokinszintézis-gátló faktor)

A szintetikus humán CSIF-gént több, kémiai szin-  
tetizált kétszálú DNS-fragmentumból állítjuk össze, és így állítjuk elő a TAC-RBS-h-CSIF elnevezésű expressziós vektort. A klónozást és az expressziót standard bakteriális rendszerben [Vieira és Messing; *Gene*, 19, 259–268 (1982)] végezzük. A restrikciós endonukleázokkal való emésztéseket és a ligázreakciókat standard technikák szerint végezzük [például: Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982)].

Kis mennyiségű plazmid előállítására az alkalikus módszert (Maniatis, et al., lásd fentebb) használjuk. Nagy mennyiségben való előállításukhoz módosított alkalikus módszert használunk, amelyben azonos mennyiségű izopropil-alkohollal csapjuk ki a nukleinsavakat a derített lizátumból. Az RNS-t hideg 2,5 M ammónium-acetáttal való kicsapással távolítjuk el, és ezután cézium-kloriddal egyensúlyi sűrűséggradiens-centrifugálást és etidium-bromidos kimutatást végzünk.

A szűrőlemezen végzett hibridizálásnál Whatman 540 kerek szűrőket használunk a telepek felvételéhez. A telepeket ezután úgy lizáljuk és fixáljuk, hogy a szűrőket 2–2 percig 0,5 M nátrium-hidroxid és 1,5 M nátrium-klorid-tartalmú oldattal és ezután 1 M trisz-HCl (pH=8,0) és 1,5 M nátrium-klorid-tartalmú oldattal kezeljük, majd 30 percig 80 °C-on melegítjük. A hibridizálást <sup>32</sup>P-jelzett (kinázzal kezelt) szintetikus DNS-ek használatával, 42 °C-on 6 órán át a következő összetételű elegyben végezzük: 6×SSPE, 20% formamid, 0,1% nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 100 mg/ml E. coli tRNS, 100 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G–250 (BioRad). (20×SSPE készítése: 174 g nátrium-kloridot, 27,6 g nátrium-dihidrogén-foszfát–víz (1/9)-et és 7,4 g EDTA-t feloldunk 800 ml vízben, az oldat pH-ját nátrium-hidroxiddal 7,4-re állítjuk be, és térfogatát 1 literre egészítjük ki, majd autoklávban sterilizáljuk.) A szűrőket kétszer mossuk (15 percig szobahőmérsékleten) 1×SSPE, 0,1% SDS-tartalmú oldattal. Autoradiografálás (Fuji RX film) után a pozitív telepeket úgy lokalizáljuk, hogy az újból kinőtt telepeket a szűrőkön kékre színeződött telepekhez igazítjuk. A DNS-t a Sanger és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463 (1977)] szerinti didezoximódszerrel szekvenáljuk. A didezoxireakciókhoz szükséges templatok vagy az M13mp vektorokban klónozott [például Messing et al. *Nucleic Acids Res.*, 9, 309 (1981)] fontos szakaszok egyszálú DNS-ei lehetnek, vagy olyan kettős szálú DNS, amelyet minialkalikus módszerrel állítottunk elő olyan módon, hogy a denaturálást 0,2 M nátrium-hid-

roxiddal (5 perc, szobahőmérséklet) végeztük, és a 0,2 M nátrium-hidroxidot és 1,43 M ammónium-acetátot tartalmazó oldatból 2 térfogat etanollal csapjuk ki. A DNS-t foszforamidot-módszerrel is szintetizálhatjuk az Applied Biosystems 380A típusú szintetizátorával; szintézis, védőcsoportok eltávolítása, hasítás és tisztítás (7 M hígysavtartalmú PAGE, kioldás, DEAE-cellulóz kromatográfia). A módszert a 380A szintetizátor kézikönyve tartalmazza.

A klónozendó szintetikus DNS-ek (400-400 ng) komplementer szálait összekeverjük, és polinukleotid kinázzal foszforiláljuk 50 ml reakcióelegyben. A DNS-t 50 ml térfogatban, szobahőmérsékleten, 4–12 óra alatt 1 mg megfelelő restrikciós enzimmel emésztett vektor-DNS-sel ligáljuk. A foszforilálás a restrikciós enzimes emésztés, a polimerázreakciók és a ligáláshoz szükséges feltételek leírása megtalálható Maniatis és munkatársai kézikönyvében (lásd fent). A telepeket kívánt esetben lacZ<sup>+</sup>-ra jelöljük, ezért a telepeket ampicillinnel, (izopropil-tio)-béta-D-galaktoziddal (IPTG) (0,4 mM) és 5-bróm-4-klór-3-indolil-béta-D-galaktopiranoziddal (X-gal) (40 mg/ml) kiegészített L agarra szélesztjük.

A TAC-RBS vektort úgy szerkesztjük, hogy a tacP-t hordozó pDR540 plazmid (Pharmacia) egyetlen BamHI helyét DNS-polimerázzal betöltjük. Ezt azután foszforilálatlan szintetikus oligonukleotidokhoz (Pharmacia) ligáljuk, és így egy olyan kettős szálú fragmentum képződik, mely egy, az 5. számú szekvenciavázlatban megadott, általánosan elfogadott riboszóma-kötőhelyet (jele: RBS) kódol. Ligálás után az elegyet foszforiláljuk, és összekapcsoljuk az

#### ATGAGCTCAT

SstI linkerrel. Ezt a komplexet ezután SstI-gyel és EcoRI-gyel hasítjuk, majd a 173 bp méretű fragmentumot poliakrilamidgél-elektroforézissel (PAGE) izoláljuk, és beklónozzuk a pUC19 (Pharmacia) EcoRI-SstI helyére (mint alább leírjuk). A végső szerkezet (neve: TAC-RBS) RBS-ATG-polilinker szakaszok szekvenciáját a 3. ábrán mutatjuk be.

A szintetikus IL–10 gént nyolc lépésben illesztjük be a pUC19 plazmidba. Minden lépésnél a delécióktól mentes inszertumokat és/vagy inszertumokat a klónozás után úgy tudjuk kimutatni, hogy a pUC19-ben lévő lacZ(α) gént az első lépésben beépített ATG startkodon szabályozása alatt tartjuk. A delécio- és/vagy inszercióváltozásokat tartalmazó klónokat úgy szűrhetjük ki, hogy X-gal és IPTG-tartalmú L-ampicillin lemezen a kék telepeket megjelöljük. Egy másik eljárás szerint minden lépésben kis mennyiségű plazmid-DNS-készítményeken az inszertumok szekvenciáit egy univerzális szekvenálóprimer (beszerezhető például a Boehringer Mannheim cégtől) használatával egyszerűen ellenőrizhetjük.

1. lépés. A TAC-RBS vektort SstI-gyel emésztjük, T4 DNS-polimerázzal (ennek 3'-exonukleázaktivitása az SstI hasítékok 3'-kilógó szálait megemészteti, és így tompa végű fragmentumok keletkeznek) kezeljük, majd a T4 DNS-polimeráz hatástalanítása után EcoRI-gyel kezeljük. Ekkor egy 173 bp méretű,

TAB-RBS szakaszt tartalmazó olyan fragmentumot kapunk, amelynek ATG startkodonjánál tompa vége van, ellenkező végén pedig egy EcoRI hasítási hely. Végül a 173 bp hosszú TAC-RBS fragmentumot izoláljuk.

2. lépés. Az 1. lépésben izolált TAC-RBS fragmentumot összekeverjük az EcoRI/KpnI-gyel emésztett pUC19 plazmiddal és a 6. számú szekvenciavázlatban megadott 1A/B szintetikus fragmentummal, amelynek – mint alább bemutatjuk – 5'-terminális vége tompa, 3'-terminális vége pedig lépcsős a KpnI-gyel való hasítás következtében. Ez a KpnI vég szomszédos egy BstEII hellyel, és ettől 3'-irányban helyezkedik el. A fragmentumokat ligáljuk, és így kapjuk a 2. lépés szerinti pUC19-et.

3. lépés. A 7. számú szekvenciavázlatban megadott 2A/B és a 8. számú szekvenciavázlatban megadott 3A/B szintetikus fragmentumokat összekeverjük a 2. lépésben kapott, BstEII/SmaI-gyel emésztett pUC19 plazmiddal (sokszorozás és tisztítás után). A komponenseket ligáljuk, és így jutunk a 3. lépés szerinti pUC19-hez. Megjegyezzük, hogy a 3A/B fragmentum 3'-terminális vége extra bázisokat tartalmaz, amelyek SmaI tompa véget képeznek. Ezeket az extra bázisokat a 4. lépésben lehasítjuk. A 2A/H és 3A/B fragmentumok komplementer 9 csoportból álló egyszálú végeket is tartalmaznak, amelyek a keveréskor egymáshoz illeszkednek, és ez lehetővé teszi, hogy a 2A/B 5' BstEII-vel hasított vége és a 3A/B 3' tompa vége a pUC19-hez ligálódjék.

4. lépés. A 3. lépésben kapott pUC19-et AflII/XbaI-gyel emésztjük, sokszorozzuk, tisztítjuk, és összekeverjük a 9. számú szekvenciavázlatban megadott 4A/B szintetikus fragmentummal. A komponenseket ligáljuk, és így kapjuk a 4. lépés szerinti pUC19-et.

5. lépés. A 4. lépésben kapott pUC19-et XbaI/Sall-gyel emésztjük, sokszorozzuk, tisztítjuk, és összekeverjük a 10. számú szekvenciavázlatban megadott 5A/B szintetikus fragmentummal. Ligálás következik, és így képezzük az 5. lépés szerinti pUC19-et. Megjegyzendő, hogy az 5A/B lépcsős végét a 6. lépésben HpaI-gyel való emésztéssel eltávolítjuk.

6. lépés. Az 5. lépésben kapott pUC19-et HpaI/PstI-gyel emésztjük, sokszorozzuk és tisztítjuk, majd a 11. számú szekvenciavázlatban megadott 6A/B szintetikus fragmentummal keverjük össze. A komponenseket ligáljuk, és így kapjuk a 6. lépés szerinti pUC19-et.

7. lépés. A 6. lépésben kapott pUC19-et ClaI/SphI-gyel emésztjük, sokszorozzuk és tisztítjuk, majd a 12. számú szekvenciavázlatban megadott 7A/B szintetikus fragmentummal keverjük össze. A komponenseket ligáljuk, és így kapjuk a 7. lépés szerinti pUC19-et.

8. lépés. A 7. lépésben kapott pUC19-et MluI/HindIII-mal emésztjük, sokszorozzuk és tisztítjuk, majd a 13. számú szekvenciavázlatban megadott 8A/B szintetikus fragmentummal keverjük össze. A komponenseket ligáljuk, és így kapjuk azt a végső szerkezetet, amelyet ezután a JM101 E. coli K–12 törzsbe (ATCC lajstromszáma 33876) építünk be standard technikák segítségével. Tenyésztés után a JM101 sejtekből kivonjuk a pro-

teint, és a kivonat hígításait biológiai aktivitásra vizsgáljuk.

## 2. példa

### A vIL-10 kifejezése COS 7 majomsejtekben

A vIL-10 nyílt leolvasási keretét kódoló gént polimeráz-láncreakcióval sokszorozzuk olyan primerek használatával, amelyek lehetővé teszik, hogy a kiegészített fragmentumot később egy EcoRI-gyel emésztett pcD(SR $\alpha$ ) vektorba (1. ábra) építhessük be. A beépített fragmentum kódolószálat a 15. számú szekvenciavázlat ábrázolja.

Azokat a klónokat, amelyek az inszertumot a helyes irányítottsággal tartalmazzák, a vIL-10 expressziójával és/vagy a restriktions emésztetek elektroforitikus képével azonosítjuk. Egy vIL-10-et hordozó ilyen vektor pBCRF1(SR $\alpha$ ) elnevezést kapott, és letétbe helyeztük az ATCC intézményben 68193 letéti szám alatt. A pBCRF1(SR $\alpha$ ) vektort E. coli MC1061 sejtekben sokszoroztuk, standard technikákkal izoláltuk, és COS 7 majomsejtek transzformálására használtuk a következőképpen: a transzformációt megelőző napon egy-egy 100 mm átmérőjű lemezre körülbelül  $1,5 \times 10^6$  COS 7 majomsejtet oltunk le. A lemezek Dulbecco által módosított, 5% fetális borjúsérumot (FCS) és 2 mM glutamint tartalmazó Eagle táptalajt (DME) tartalmaznak. A transzformáció kiviteléhez a COS 7 sejteket tripszinnel való inkubálás segítségével távolítjuk el a csészéről, a sejteket kétszer mossuk szérumentes DME-ben, majd szérumentes DME-ben szuszpendáljuk úgy, hogy a sűrűség  $10^7$  sejt/ml legyen. A szuszpenzió 0,75 ml-éhez 20  $\mu$ g DNS-t keverünk, és átvisszük egy steril, 0,4 cm-es elektroporációs kűvetába, majd 10 perc múlva a sejteket 200 V és 960  $\mu$ F mellett pulzáljuk BioRad-féle Gene Pulser készülékben. További 10 perc múlva a sejteket eltávolítjuk a kűvetából, és hozzáadjuk 20 ml DME-hez, mely 5% FCS-t, 2 mM glutamint, penicillint, sztreptomocint és gentamicint tartalmaz. A szuszpenziót négy 100 mm-es szövettenyészítő csészébe osztjuk el egyenlő részekben. A csészéket 12–24 órán át 37 °C-on, 5% széndioxid-tartalmú atmoszférában tartjuk, majd a táptalajt lecseréljük hasonló táptalajra, amely csak 1% FCS-t tartalmaz. Az inkubálást további 72 órán át folytatjuk 37 °C-on széndioxid mellett. Utána a táptalajt összegyűjtjük, és arra vizsgáljuk, hogy képes-e gátolni az IFN-szintézist.

Frissen izolált perifériásvérfocita-szuszpensióból (körülbelül  $2 \times 10^6$  sejt/ml) 100 ml-eket PHA-val (fitohemagglutinin) (100  $\mu$ g/ml) 37 °C-on inkubálunk olyan táptalajban, melynek (i) 90%-át 5% FCS-vel és 2 mM glutaminnal kiegészített DME és (ii) 10%-át olyan COS 7 sejtek felülűszója alkotja, melyeket előzőleg pBCRF1(SR $\alpha$ ) plazmiddal transzformáltunk. A sejteket és a felülűszókat 24 óra múlva learatjuk, és IFN-mRNS, illetve IFN- $\gamma$ -protein-tartalomra vizsgáljuk. A kontrollokat azonos módon kezeljük, kivéve, hogy olyan COS 7 tenyészetekről származik a 10%-nyi felülűszó, amelyeket egy nemrokon cDNS-inszertumot hordozó plazmiddal transzformáltunk. A vIL-10-zel ke-

zelt minták a kontrollokhoz képest az IFN-szintézis 50%-os gátlását okozták.

## 3. példa

### A vIL-10 kifejezése Escherichia coliban

A 4. számú szekvenciavázlattal ábrázolt érett vIL-10-et kódoló gén E. coliban kifejezhető.

A pBCRF1(SR $\alpha$ ) cDNS-inszertumát beklónozzuk egy M13 plazmidba, ahol kétszer módosítjuk helyre irányuló mutagenézissel: először egy ClaI helyet hozunk létre az érett vIL-10 polipeptid kódoló szakasz 5'-végén, és másodszor egy BamHI helyet képezünk az érett vIL-10 polipeptid kódoló szakasz 3'-végén. A mutagenizált szekvenciát ezután könnyen be tudjuk építeni az alább leírt TRPC11 expressziós vektorba.

A TRPC11 vektort a következőképpen szerkesztjük meg: egy szintetikus, általánosan elfogadott RBS fragmentumot ClaI linkerekhez (ATGCAT) ligálunk, és a kapott fragmentumokat ClaI-gyel hasított pMT11hc plazmidba (melyet előzőleg úgy módosítottunk, hogy ClaI helyet tartalmazzon) klónozzuk be. A pMT11hc a pBR322-nek egy kicsiny, 2,3 kb méretű, nagy másolat-számú, AMP<sup>R</sup> TET<sup>S</sup> származéka, és ez az nVX plazmid EcoRI-HindIII polilinkerszakaszát tartalmazza (az nVX-et Maniatis és munkatársai írták le: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Az említett plazmidot, hogy ClaI helyet tartalmazzon, a következőképpen módosítjuk: a pMT11hc-t EcoRI-gyel és BamHI-gyel hasítjuk, a kapott ragados végeket betöltjük, és ClaI linkerhez (CATCGATG) ligáljuk. Így helyreállítottuk az EcoRI és BamHI helyeket, és a SmaI helyet ClaI helyre cseréltük ki. A TRPC11 szerkezet egy transzformált egyede egy tandem RBS szekvenciát tartalmazott, melyet ClaI helyek határoltak. Az egyik ClaI helyet és az RBS szekvencia második kópiáját úgy távolítjuk el, hogy a plazmidot PstI-gyel emésztjük, majd Bal31 nukleázal kezeljük, EcoRI-gyel hasítjuk és T4 DNS-polimerázzal kezeljük a négy dezoxinukleotid-trifoszfát jelenlétében. A kapott 30–40 bp méretű fragmentumokat PAGE segítségével izoláljuk, és beklónozzuk SmaI-gyel hasított pUC12-be. A pKC101-ből [Nichols et al., Methods in Enzymology, 101, 155 (Academic Press, N.Y., 1983)] származó, E. coli trpP-t hordozó 248 bp méretű EcoRI fragmentumot ezután beklónozzuk az EcoRI helyre, hogy a 2. ábrán látható TRPC11 szerkezetét teljessé tegyük. A TRPC11-et a vIL-10 vektoraként alkalmazzuk úgy, hogy először ClaI-gyel és BamHI-gyel emésztjük, tisztítjuk, majd egy standard ligálóelegyben az M13 ClaI-BamHI fragmentumhoz keverjük, amely az érett BCRF1-et kódoló nukleotidszekvenciát tartalmazza. A TRPC11-et tartalmazó inszertumot, melyet TRPC11-BCRF1-nek neveztünk, E. coli K12 JM101 törzsben (hozzáférhető az ATCC-nél 33876 lajstromszámon) szaporítottuk.

## 4. példa

### Tumorok szuppressziója IL-10-zel egerekben

Az IL-10 tumorok növekedésére gyakorolt hatását egy olyan módszerrel vizsgáljuk, amely hasonló a

Tepper és munkatársai által leírt [Cell, 57, 503–512 (1989)] módszerhez. Röviden kifejtve: az általunk alkalmazott módszerben egy szingenikus tumorsejtvonalból származó két sejtcsoporttal külön-külön oltunk egereket. Az egyik sejtcsoport egy IL–10-et kifejező plazmida stabilan transzfektált sejtekből áll, a másik sejtcsoport egy nem transzfektált kontrollcsoport. Ezután összehasonlítjuk a két sejtcsoport sejtjeivel külön-külön oltott egerekben a tumorképződés előfordulását.

A kísérletekben BALB/c egereket oltottunk vagy transzfektált, vagy nem transzfektált NS1 mielómatumor-sejtekkel. (Az NS1 sejteket pGSRG plazmida (lásd a 3. ábrát) transzfektáljuk elektroporáció segítségével. Így a plazmid vagy az egér-IL–10, vagy a virális IL–10, vagy a humán IL–10 nyílt leolvasási keretét (ORF=open reading frame) tartalmazza az XhoI restriktációs helyre beépítve. A pGSRG olyan markert tartalmaz, mely lehetővé teszi a stabilan transzformált NS1 sejtek meghatározását. A pGSRG a Schnes és munkatársai által leírt (Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 6904–6908 (1987)) pSVDT egy származéka. Az IL–10 inszertumot tartalmazó pGSRG plazmidokat a következőképpen kapjuk: a pH5C, pBCRF1 és XpcD(SR $\alpha$ )-F115 plazmidok számára EcoRI linkszekvenciákat tartalmazó PCR-primereket készítünk úgy, hogy az illető cDNS-inszertumot nyílt leolvasási kereteit szaporíthassuk. Ezután az EcoRI-gyel emésztett pcD(SR $\alpha$ ) vektorokba klónozott nyílt leolvasási kereteket külön fejezzük ki, hogy kiválasszuk azokat a vektorokat, amelyek a nyílt leolvasási kereteket a helyes irányítottságban tartalmazzák. Végül a pcD(SR $\alpha$ ) XhoI fragmentumait a megfelelő, XhoI-gyel emésztett pGSRG plazmidokba klónozzuk be.

Az NS1 sejteket a következőképpen transzfektáljuk a pGSRG plazmidokkal. Egy 100 mm átmérőjű Petri-csészéből a félig összefolyt sejteket ( $2-3 \times 10^6$ ) lecentrifugáljuk; egyszer mossuk steril, foszfáttal pufferolt konyhasóoldattal (PBS), lecentrifugáljuk, és 0,5 ml PBS-ben reszuspendáljuk. Ezután 1 ml PBS-ben 20–100  $\mu$ g plazmid-DNS-t szuszpendálunk. A sejteket és a DNS-t összekeverjük, küvetába helyezzük, jégre tesszük, majd elektrosokkoljuk BioRad-féle Gene Pulser készülékben, 200–300 V és 960  $\mu$ F kapacitás mellett. Tíz perc múlva a jégen tartott sejteket standard 96 tartályos mikrotitrálólemezekre visszük, 100  $\mu$ l-eket bemérve. Ezután 48–78 óra múlva minden tartályhoz hozzáadunk 100  $\mu$ l mikofenolsavas szelektív tápoldatot (DME High Glucose tápoldatban 0,5  $\mu$ g/ml mikofenolsav, 100  $\mu$ g/ml xantin, 15  $\mu$ g/ml hipoxantin, 12–15% fetális borjúsérum, 600  $\mu$ g/ml glutamin).

Egy első kísérletben 4, 3, 4, illetve 5 egeret oltottunk intraperitoneálisan  $5 \times 10^6$  nem transzformált sejttel (kontroll), pGSRG–mIL–10-zel transzformált sejtekkel, pGSRG–vIL–10-zel transzformált sejtekkel, illetve pGSRG–hIL–10-zel transzformált sejtekkel. Négy hét múlva a 4 kontrollcsoportból 3-ban látható tumorok képződtek; négy hét múlva egyik kísérleti egerben sem fejlődtek ki tumorok.

Egy második kísérletben 16 egeret oltottunk (intraperitoneálisan  $5 \times 10^6$  nem transzformált sejttel, és 15 egeret oltottunk intraperitoneálisan  $5 \times 10^6$  pGSRG–mIL–10-zel transzformált sejtekkel. Két hét múlva a 16 kontrollcsoport közül 8-ba újból beoltottunk  $5 \times 10^6$  nem transzformált sejteket, és a 15 kísérleti eger közül 7-be újból beoltottunk  $5 \times 10^6$  pGSRG–mIL–10-transzformált sejteket. Az első injekciók után 4 hét múlva tumorképződésre vizsgáltuk az egereket. A 16 kontrollcsoportból 16-ban látható tumorok fejlődtek, a kísérleti egerek közül egyben sem fejlődött ki tumorra utaló jel.

A találmány fentiekben leírt megvalósítási módokat a szemléltetés és jellemzés céljából ismertettük. A leírás nem kívánt részletekbe bocsátkozni, és nem kívánta korlátozni a találmány oltalmi körét a leírt speciális megoldásokra, ugyanis kétségtől számítható módosítás és változtatás végezhető a fentiekben előadottak alapján. A kiviteli alakokat úgy választottuk meg és úgy írtuk le, hogy azok a találmány elveinek legjobb magyarázatát adják. A gyakorlott szakemberek tehát jól tudják hasznosítani a találmányt különböző megvalósítási formákban és különböző módosításokkal is, minthogy az ismertett megvalósítási formák egy elképzelt speciális felhasználáshoz is alkalmasak. A találmány oltalmi körét a csatolt szabadalmi igénypontokban határozzuk meg.

A feltalálók a pH5C, pH15C, illetve pBCRF1(SR $\alpha$ ) plazmidokat tartalmazó E. coli MC1064 tenyészeteket letétbe helyezték az American Type Culture Collection intézményben (ATCC: Rockville, MD, USA) 68192, illetve 68193 letéti számok alatt. A letétbe helyezés a TCC „Szabadalmi Célok Szolgáltató Letétek”-re vonatkozó megállapodásban kikötött feltételek mellett történt. E megállapodás biztosítja, hogy a letét – a 35 USC 122 és 37 CFR 1.14 értelmében – rendelkezésre álljon az Egyesült Államok szabadalmak és védjegyek ügyében eljáró kormánybiztos számára, valamint egy egyesült államokbeli szabadalmi per esetén is. Fentiek megkívánják a letét fenntartását. A letétbe helyezett törzs hozzáférhetősége nem úgy értelmezendő, hogy a szabadalmat fel lehet használni azon jogok megsértésével, amelyeket az egyes kormányok hatalmi szervei szabadalmi törvényeikben elfogadtak.

A szövegben említett szekvenciavázlatok leírását a következő oldalakon adjuk meg.

#### 1. számú szekvenciavázlat

A szekvencia típusa: aminosav

A szekvencia hossza: 178 aminosavmaradék

A szekvencia számtípusa: egyszál

Topológia: lineáris

A molekula típusa: protein

Eredeti forrás (származás): humán

Tulajdonságok: humán IL–10 (humán citokinszintézis-gátló faktor, humán CSIF=human cytokine synthesis inhibitory factor)

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly  
5 10 15

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Val | Arg | Ala | Ser | Pro | Gly | Gln | Gly | Thr | Gln | Ser | Glu | Asn | Ser | Cys |  |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |  |
| Thr | His | Phe | Pro | Gly | Asn | Leu | Pro | Asn | Met | Leu | Arg | Asp | Leu | Arg |  |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |  |
| Asp | Ala | Phe | Ser | Arg | Val | Lys | Thr | Phe | Phe | Gln | Met | Lys | Asp | Gln |  |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |  |
| Leu | Asp | Asn | Leu | Leu | Leu | Lys | Glu | Ser | Leu | Leu | Glu | Asp | Phe | Lys |  |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |  |
| Gly | Tyr | Leu | Gly | Cys | Gln | Ala | Leu | Ser | Glu | Met | Ile | Gln | Phe | Tyr |  |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |  |
| Leu | Glu | Glu | Val | Met | Pro | Gln | Ala | Glu | Asn | Gln | Asp | Pro | Asp | Ile |  |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |  |
| Lys | Ala | His | Val | Asn | Ser | Leu | Gly | Glu | Asn | Leu | Lys | Thr | Leu | Arg |  |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |  |
| Leu | Arg | Leu | Arg | Arg | Cys | His | Arg | Phe | Leu | Pro | Cys | Glu | Asn | Lys |  |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |  |
| Ser | Lys | Ala | Val | Glu | Gln | Val | Lys | Asn | Ala | Phe | Asn | Lys | Leu | Gln |  |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |  |
| Glu | Lys | Gly | Ile | Tyr | Lys | Ala | Met | Ser | Glu | Phe | Asp | Ile | Phe | Ile |  |
|     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |  |
| Asn | Tyr | Ile | Glu | Ala | Tyr | Met | Thr | Met | Lys | Ile | Arg | Asn |     |     |  |
|     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |  |

## 2. számú szekvenciavázlat

A szekvencia típusa: aminosav

A szekvencia hossza: 170 aminosavmaradék

A szekvencia száltípusa: egyszál

Topológia: lineáris

25 A molekula típusa: protein

Tulajdonságok: virális IL-10 (BCRF1)

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

## 3. számú szekvenciavázlat

A szekvencia típusa: aminosav

A szekvencia hossza: 160 aminosavmaradék

A szekvencia száltípusa: egyszál

Topológia: lineáris

55 A molekula típusa: protein

Eredeti forrás (származás): humán

Tulajdonságok: érett humán IL-10 (érett humán CSIF)

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Ser | Pro | Gly | Gln | Gly | Thr | Gln | Ser | Glu | Asn | Ser | Cys | Thr | His | Phe |  |
|     |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |  |

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

## 4. számú szekvenciavázlat

A szekvencia típusa: aminosav

A szekvencia hossza: 147 aminosavmaradék

A szekvencia száltípusa: egyszál

Topológia: lineáris

A molekula típusa: protein

Tulajdonságok: virális IL-10 (BCRF1)

25

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

## 5. számú szekvenciavázlat

A szekvencia típusa: nukleotid

A szekvencia hossza: 15 bázis

A szekvencia száltípusa: egyszál

Topológia: lineáris

A molekula típusa: DNS

Közvetlen származás (eredet): szintetikus (kereskedelmi, Pharmacia)

Sajátosságok: egy általánosan elfogadott riboszóma-kötőhelyet (consensus ribosome binding site) kódoló kétszálú fragmentum

GTAAGGAGGT TTAAC

15 60

## 6. számú szekvenciavázlat

A szekvencia típusa: nukleotid

50 A szekvencia hossza: 56 bázispár, 4 bázisos ragadós véggel

A szekvencia száltípusa: kétszál

Topológia: lineáris

A molekula típusa: DNS

55 Közvetlen származás (eredet): szintetikus

Sajátosságok: a kisbetűk azt jelzik, hogy egy bázis különbözik a natív szekvenciában ugyanazon a helyen lévő bázistól

Tulajdonságok: a szintetikus CSIF-gén 1A/B fragmentuma

AGCCCAGGCC AGGGCACCCA GTCTGAGAAC AGCTGCACCC ACTTCCCAGG 50  
 TCGGGTCCGG TCCCGTGGGT CAGACTCTTG TCGACGTGGG TGAAGGGTCC  
 tAACCGg t a c 60  
 aTTGGc

7. számú szekvenciavázlat

A szekvencia típusa: nukleotid  
 A szekvencia hossza: 48 bázispár 5 és 9 bázisos ragadós végekkel  
 A szekvencia száltípusa: kétszálás  
 Topológia: lineáris  
 A molekula típusa: DNS

Közvetlen származás (eredet): szintetikus

Sajátosságok: a kisbetűk azt jelzik, hogy egy bázis különbözik a natív szekvenciában ugyan-ezen a helyen lévő bázistól

10 Tulajdonságok: a szintetikus CSIF-gén 2A/B fragmentuma

GtAACCTGCC TAACATGCTT CGAGATCTCC GAGATGCCTT CAGCAGAGTG 50  
 GACGG ATTGTACGAA GCTCTAGAGG CTCTACGGAA GTCGTCTCAC  
 AAGACTTTCT TT 62  
 TTC

8. számú szekvenciavázlat

A szekvencia típusa: nukleotid  
 A szekvencia hossza: 35 bázispár 9 bázisos ragadós véggel  
 A szekvencia száltípusa: kétszálás  
 Topológia: lineáris  
 A molekula típusa: DNS

Közvetlen származás (eredet): szintetikus

20 Sajátosságok: a kisbetűk azt jelzik, hogy egy bázis különbözik a natív szekvenciában ugyan-ezen a helyen lévő bázistól

Tulajdonságok: a szintetikus CSIF-gén 3A/B fragmentuma

25

C AAATGAAGGA TCAGCTGGAC AACTTGTTcT tAAG 35  
 TGAAAGAAAG TTTACTTCCT AGTCGACCTG TTGAACAAGa aTTC

9. számú szekvenciavázlat

A szekvencia típusa: nukleotid  
 A szekvencia hossza: 69 bázispár 4 bázisos ragadós véggel  
 A szekvencia száltípusa: kétszálás  
 Topológia: lineáris  
 A molekula típusa: DNS

30 Közvetlen származás (eredet): szintetikus

Sajátosságok: a kisbetűk azt jelzik, hogy egy bázis különbözik a natív szekvenciában ugyan-ezen a helyen lévő bázistól

Tulajdonságok: a szintetikus CSIF-gén 4A/B fragmentuma

35

CTCAGGAACG ACCTCCTGAA ATTCCCAATG GACCCAACGG TTCGGAACAG 69  
 TGAGATGATC CAGTTTtA t  
 ACTCTACTAG GTCAAAATaG AtC

10. számú szekvenciavázlat

A szekvencia típusa: nukleotid  
 A szekvencia hossza: 61 bázispár 4-bázisos ragadós véggel  
 A szekvencia száltípusa: kétszálás  
 Topológia: lineáris  
 A molekula típusa: DNS

Közvetlen származás (eredet): szintetikus

Sajátosságok: a kisbetűk azt jelzik, hogy egy bázis különbözik a natív szekvenciában ugyan-ezen a helyen lévő bázistól

Tulajdonságok: a szintetikus CSIF-gén 5A/B fragmentuma

45

CTaGAGGAGG TGATGCCCCA AGCTGAGAAC CAAGACCCAG ACATCAAGGC 50  
 GA tCTCCTCC ACTACGGGGT TCGACTCTTG GTTCTGGGTC TGTA GTTCCG  
 GCATGT tAAC g 61  
 CGTACAaTTG c a g c t

11. számú szekvenciavázlat

A szekvencia típusa: nukleotid  
 A szekvencia hossza: 59 bázispár 4 bázisos ragadós véggel  
 A szekvencia száltípusa: kétszálás  
 Topológia: lineáris

A molekula típusa: DNS

Közvetlen származás (eredet): szintetikus

Sajátosságok: a kisbetűk azt jelzik, hogy egy bázis különbözik a natív szekvenciában ugyan-ezen a helyen lévő bázistól

60

Tulajdonságok: a szintetikus CSIF-gén 6A/B fragmen-  
tuma

AACTCCCTGG GGGAGAACCT GAAGACCCTC AGGCTGAGGC TACGGCGCTG 50  
TTGAGGGACC CCCTCTTGGG CTTCTGGGAG TCCGACTCCG ATOCCGCGAC  
TCATCGATc t g c a 63  
AGTAGCTAg

12. számú szekvenciavázlat

A szekvencia típusa: nukleotid  
A szekvencia hossza: 54 bázispár 2 és 4 bázisos raga-  
dós végekkel  
A szekvencia szálltípusa: kétszálás  
Topológia: lineáris  
A molekula típusa: DNS

Közvetlen származás (eredet): szintetikus

10 Sajátosságok: a kisbetűk azt jelzik, hogy egy bázis kü-  
lönbözik a natív szekvenciában ugyan-  
ezen a helyen lévő bázistól

Tulajdonságok: a szintetikus CSIF-gén 7A/B fragmen-  
tuma

CGATTTCTTC CCTGTCAAAA CAAGAGCAAG GCCGTGGAGC AGGTGAAGAA 50  
TAAAGAAG GGACAGTTTT GTTCTCGTTC CGGCACCTCG TCCAATTCTT  
cGCgTgc a t g 60  
gCGcAc

13. számú szekvenciavázlat

A szekvencia típusa: nukleotid  
A szekvencia hossza: 45 bázispár 4 és 9 bázisos raga-  
dós végekkel  
A szekvencia szálltípusa: kétszálás  
Topológia: lineáris  
A molekula típusa: DNS

Közvetlen származás (eredet): szintetikus

Sajátosságok: a kisbetűk azt jelzik, hogy egy bázis kü-  
lönbözik a natív szekvenciában ugyan-  
ezen a helyen lévő bázistól

Tulajdonságok: a szintetikus CSIF-gén 8A/B fragmen-  
tuma

CGCGTTTAAT AATAAGCTCC AAGACAAAGG CATCTACAAA GCCATGAGTG 50  
AAATTA TTATTCGAGG TTCTGTTTCC GTAGATGTTT CGGTACTCA  
AGTTTGAC 58

14. számú szekvenciavázlat

A szekvencia típusa: nukleotid  
A szekvencia hossza: 51 bázispár 9 és 4 bázisos raga-  
dós végekkel  
A szekvencia szálltípusa: kétszálás  
Topológia: lineáris  
A molekula típusa: DNS

Közvetlen származás (eredet): szintetikus

35 Sajátosságok: a kisbetűk azt jelzik, hogy egy bázis kü-  
lönbözik a natív szekvenciában ugyan-  
ezen a helyen lévő bázistól

Tulajdonságok: a szintetikus CSIF-gén 9A/B fragmen-  
tuma

CTCAAAGTGT AGAAGTAGTT GATGTATCTT CGGATGTACT GTTACTTCTA  
ACGAAAGTGA 60  
TGCTTTGACT t c g a

15. számú szekvenciavázlat

A szekvencia típusa: nukleotid  
A szekvencia hossza: 499 bázis  
A szekvencia szálltípusa: egyszálás

Topológia: lineáris

A molekula típusa: DNS

Tulajdonságok: a virális IL-10-et kódolja

50

AATTC ATG GAG CGA AGG TTA GTG GTC ACT CTG CAG TGC CTG GTG 44  
CTG CTT TAC CTG GCA CCT GAG TGT GGA GGT ACA GAC CAA TGT 86  
GAC AAT TTT CCC CAA ATG TTG AGG GAC CTA AGA GAT GCC TTC 128  
AGT CGT GTT AAA ACC TTT TTC CAG ACA AAG GAC GAG GTA GAT 170  
AAC CTT TTG CTC AAG GAG TCT CTG CTA GAG GAC TTT AAG GOC 212  
TAC CTT GGA TGC CAG GCC CTG TCA GAA ATG ATC CAA TTC TAC 254  
CTG GAG GAA GTC ATG CCA CAG GCT GAA AAC CAG GAC CCG GAG 296  
GCT AAG GAC CAT GTC AAT TCT TTG GGT GAA AAT CTA AAG ACC 338  
CTA CGG CTC CGC CTG CGC AGG TGC CAC AGG TTC CTG CCG TGT 380

|                                                         |     |
|---------------------------------------------------------|-----|
| GAG AAC AAG AGT AAA GCT GTG GAA CAG ATA AAA AAT GCC TTT | 422 |
| AAC AAG CTG CAG GAA AAA GGA ATT TAC AAA GCC ATG AGT GAA | 464 |
| TTT GAC ATT TTT ATT AAC TAC ATA GAA GCA TAC ATG ACA ATT | 506 |
| AAA GCC AGG TGA G                                       | 519 |

#### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás tumorok kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy interleukin-10 hatásos mennyiségét egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval vagy segédanyaggal keverjük, és a keveréket gyógyszerkészítménnyé formázzuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy vírus-interleukin-10-et vagy humán interleu-

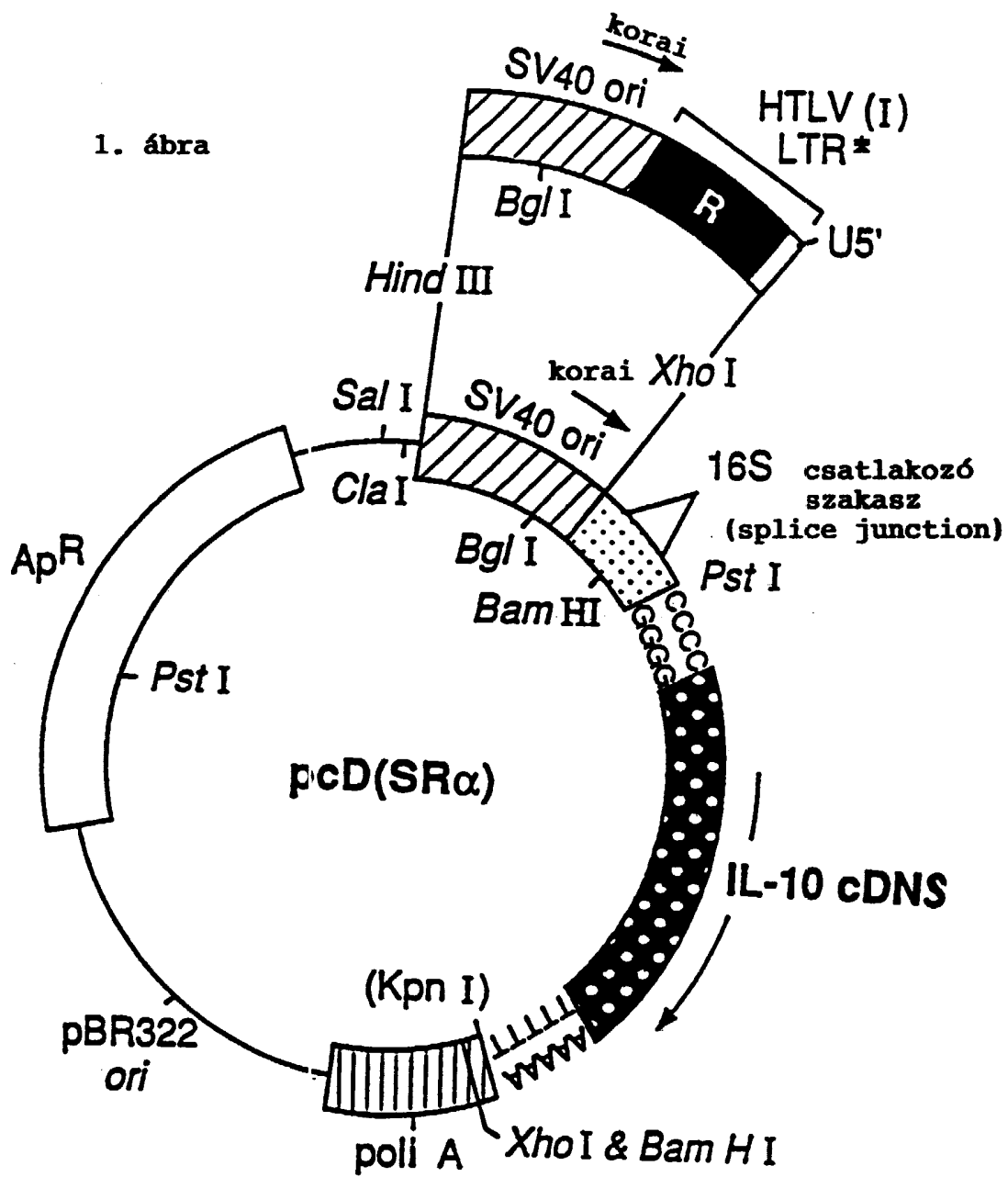
kin-10-et keverünk egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval vagy segédanyaggal.

10 3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a keveréket folyamatos infúzióban való beadásra alkalmas készítménnyé formázzuk.

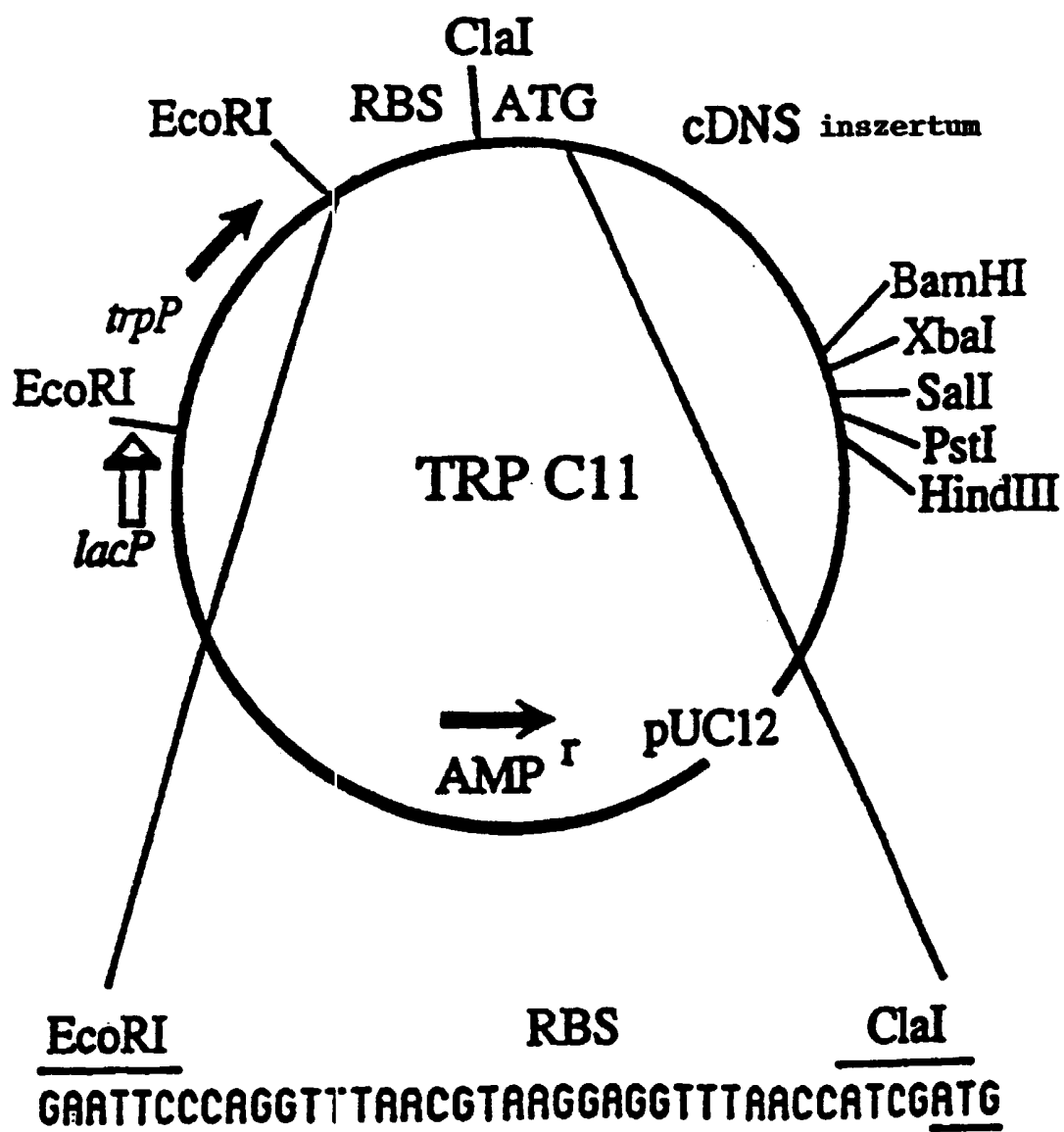
4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a keveréket 50–800 µg/nap tartományba eső dózisok beadására alkalmas készítménnyé formázzuk.

15

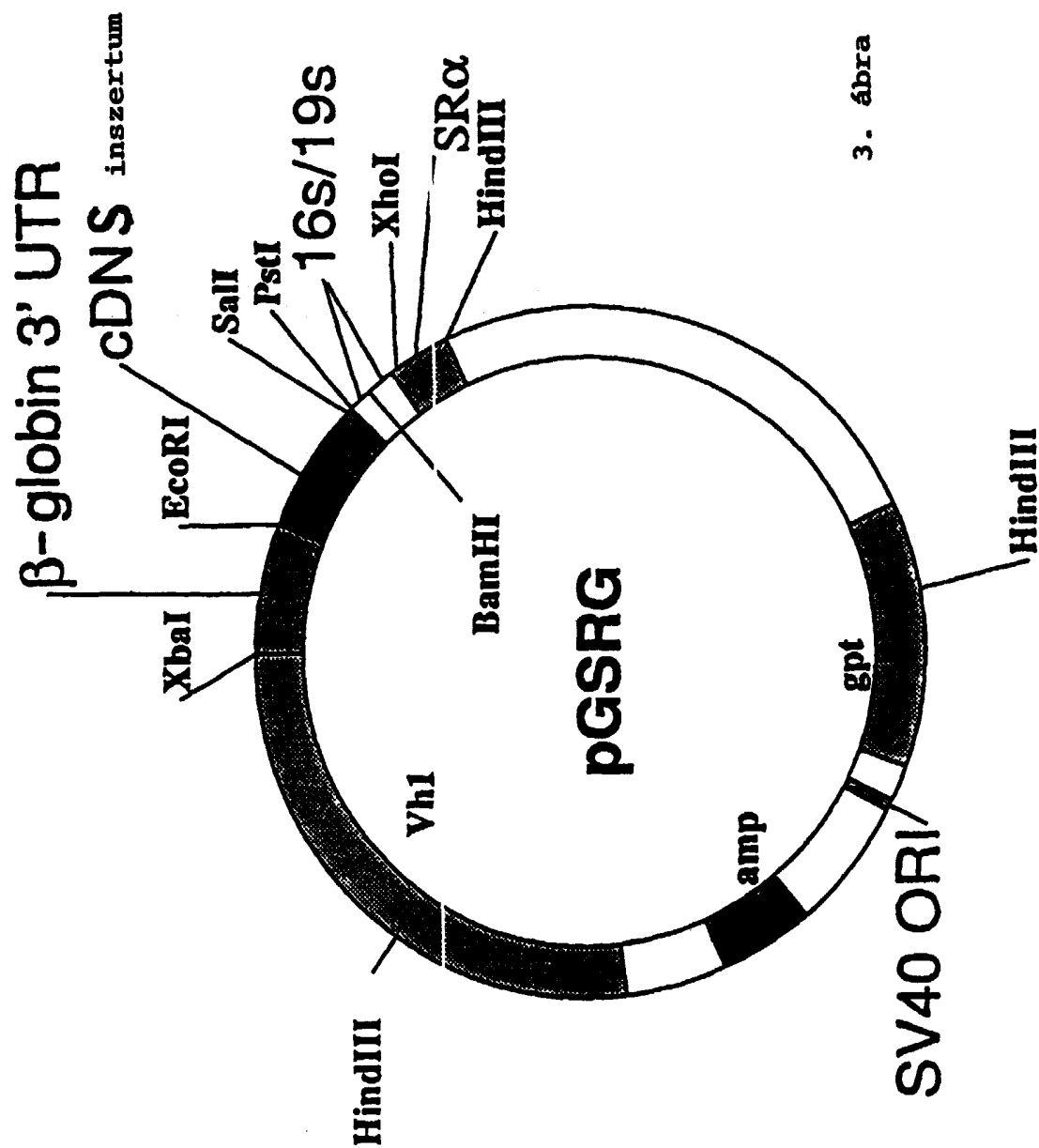
## 1. ábra



\*LTR = long terminal repeat (hosszú ismétlődő végszakasz)



2. ábra



3. ábra