

#/02

15050/92

REKOMBINÁNS ELJÁRÁS HIRUDIN ÉS HIRUDINSZERŰ ÚJ POLIPEPTIDEK  
ELŐÁLLÍTÁSÁRA

FARMITALIA CARLO ERBA S.r.l. Milánó, Olaszország

Bejelentés napja: 1991. 04. 05.

Elsőbbsége: 1990. 05. 10. (9010552.9) Nagy-Britannia

Nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP91/00643

Nemzetközi közzététel száma:

59961

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

K I V O N A T

A találmány szerinti rekombináns DNS eljárással előállított hirudin és hirudinszerű polipeptidek antitrombin-aktivitással rendelkeznek. A hirudint és hirudinszerű polipeptideket előnyösen E. coli vagy rovarsejtekben expresszálják. A hirudinszerű polipeptid előnyösen egy HV1-ből és HV2-ből származó hibrid protein, amelynek aminosavszekvenciája:

Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-  
-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-  
-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-  
-Pro-Asn-Pro-Glu-Ser-His-Asn-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-  
-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln,

amelyben az aláhúzott szakasz a HV2-ből származó rész.

*Handwritten note:*  
Nem  
"Leu" a helyén áll

Képviselő:

8/92

15050 /92

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA KFT.

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

59961

"B"  
LSO:  
C12N 15/15  
C12N 1/21  
C12N 5/10  
C127 21/02  
A61K 37/64

REKOMBINÁNS ELJÁRÁS HIRUDIN ÉS HIRUDINSZERÜ ÚJ POLIPEPTIDEK  
ELŐÁLLÍTÁSÁRA

FARMITALIA CARLO ERBA S.r.l. Milánó, Olaszország

Feltalálók:

BENATTI Luca,	Milánó,
CARMINATI Paolo,	Milánó,
LANSEN Jaqueline,	Milánó,
MAZUE' Guy,	Milánó,
RONCUCCI Romeo,	Milánó,
SARMIENTOS Paolo,	Milánó,
SCACHERI Emanuela,	Milánó,
DE TAXIS DU POET Philippe,	Milánó,

Olaszország

Bejelentés napja: 1991. 04. 05.

Elsőbbsége: 1990. 05. 10. (9010552.9) Nagy-Britannia

Nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP91/00643

Nemzetközi közzététel száma: 40 91 / 17250

73954-3527-SI

A találmány tárgya eljárás az eredetileg *Hirudo medicinalis*-ből izolált hirudin, valamint annak származékai előállítására.

Az antikoaguláns hatású polipeptidek közül talán legismertebbek a hirudinok csoportjába tartoznak. A hirudin - amelyet először orvosi piócából (*Hirudo medicinalis*) izoláltak - a trombin ismert és kimerítően jellemzett inhibitorra [Markwardt F., *Methods in Enzymology*, 19, 924 (1970); Markwardt F., *Biomed. Biochim. Acta* 44, 1007 (1985)]. A hirudin a trombint ionos kölcsönhatások révén köti meg, ezáltal megakadályozza a fibrinogén fibrinné hasítását, és ezt követően a fibrinrög kialakulását. Állatkísérletekben bizonyították a hirudin vénás trombozist, vaszkuláris elzáródást és a trombin-indukálta elszórt intravaszkuláris koagulálást gátló hatását. Ezenkívül a hirudin toxicitása csekély, antigén sajáttsága nincs, vagy csak kismértékű, és a keringési rendszerből igen gyorsan kiürül [Markwardt F., Hauptman J., Nowak G., Klessen C. és Walsmann P., *Thromb. Haemostasis* 47, 226 (1982)].

A hirudin természetes variánsai ismertek. A HV1-nek jelölt első variáns szekvenciáját Dodt és munkatársai határozták meg [FEBS 165 180-184 (1984)]. A HV1 szekvenciája a hárombetűs kód szerint az alábbi [Eur. J. Biochem. 138, 9-37 (1984)]:

Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-  
-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-  
-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-  
-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-

-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln.

SO<sub>3</sub>H

A HV2-nek jelölt második variánst is Dodt és munkatársai ismertették [Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367, 803-811 (1986)]. A HV2 az alábbiakban különbözik a HV1-től: 1-es helyzetben Val helyett Ile, 2-es helyzetben Val helyett Thr, 24-es helyzetben Gln helyett Lys, 33-as helyzetben Asp helyett Asn, 35-ös helyzetben Glu helyett Lys, 36-os helyzetben Lys helyett Gly, 47-es helyzetben Lys helyett Asn, 49-es helyzetben Gln helyett Glu és 53-as helyzetben Asp helyett Asn van a szekvenciában.

A HV3-nak jelölt harmadik variánst Harvey és munkatársai ismertették [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1084-1088 (1986)]. A HV3 az 1-32. helyzetű aminosavakat tekintve azonos a HV2-vel, és a HV1-től az alábbiakban különbözik: 33-as helyzetben Asp helyett Val, 35-ös helyzetben Glu helyett Lys, 53-as helyzetben Asp helyett Gln, 33-as helyzetben Asp helyett Asn, 58-as helyzetben Glu helyett Pro, 62-es helyzetben Glu helyett Asp, 63-as helyzetben Tyr-SO<sub>3</sub>H helyett Ala, 64-es helyzetben Leu helyett Asp és 65-ös helyzetben Gln helyett Glu van a szekvenciában.

A találmány új eljárást nyújt a hirudinok és a hirudinszerű polipeptidek előállítására. A találmány értelmében kémiai szintézissel előállítjuk a hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet kódoló nukleotidszekvenciát, és a hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet egy rekombináns szervezetben kifejezzük. A genetikailag módosított organizmus tenyésztése teljes biológiai aktivitással rendelkező kívánt

terméket eredményez.

A találmány tárgya ennek megfelelően eljárás a hirudint vagy egy hirudinszerű polipeptidet kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó expressziós vektor előállítására. A találmány tárgya továbbá eljárás egy találmány szerinti kompatibilis expressziós vektorral transzformált gazdaszervezet, valamint egy hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet kódoló szintetikus DNS-szekvencia előállítására. A hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet kódoló DNS-fragmens egyes vagy ketős szálú lehet.

A hirudin vagy hirudinszerű polipeptid expresszállására képes gazdaszervezetet úgy állítjuk elő, hogy a gazdát egy kompatibilis találmány szerinti expressziós vektorral transzformáljuk. Az expressziós vektort úgy állítjuk elő, hogy

- (a) kémiaailag szintetizálunk egy hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet kódoló DNS-szekvenciát, és
- (b) a fenti DNS-szekvenciát egy expressziós vektorba illesztjük.

A hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet ennek megfelelően úgy állítjuk elő, hogy a találmány szerinti transzformált gazdaszervezetet a hirudin vagy hirudinszerű polipeptid expresszállására alkalmas körülmények között tenyésztjük, majd a hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet izoláljuk. A fentiek szerinti eljárva tiszta formában kapjuk a hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet.

A leírásban hirudin vagy hirudinszerű polipeptid alatt a természetes, HV1, HV2 vagy HV3 formájú hirudint, va-

lamint ezek származékait értjük, amelyeket például aminosav helyettesítéssel, delécióval, inszercióval, extenzióval, funkcionalizálással és kémiai módosítással nyerhetünk. A tá-lálmány ennek megfelelően a HV1, HV2 vagy HV3 antitrombin-aktivitással rendelkező származékaira is vonatkozik.

A HV1, HV2 vagy HV3 aminosavszekvenciáját egy vagy több aminosav helyettesítésével, inszerciójával és/vagy deléciójával, és/vagy egyik vagy mindkét végén való meghosz-szabbításával (extenzióval) módosíthatjuk. A fenti módon módosított szekvenciájú származéknak azonban természetesen rendelkeznie kell az antitrombin-aktivitással. A HV1, HV2 vagy HV3 aminosavszekvenciája és a fenti származékok aminosavszekvenciája között a homológia fokának legalább 75 %-nak kell lennie. A homológia foka előnyösen legalább 85 %, még előnyösebben legalább 95 % lehet.

Például a HV1, HV2 vagy HV3 aminosavszekvenciájában egy vagy több aminosavmaradékot más aminosavmaradékkal helyettesíthetünk, vagy egy vagy több aminosavmaradékot el-hagyhatunk, vagy egy vagy több további aminosavmaradékot beilleszthetünk. Az eredeti szekvencia fizikai-kémia tulaj-donsága, például töltéssűrűsége, hidrofób/hidrofil jellege, mérete és konfigurációja megőrződhet. Megfelelő helyettesí-tések lehetnek az egybetűs kód [Eur. J. Biochem. 138, 9-37 (1984)] szerint az alábbiak:

G helyett A, és fordítva,

V helyett A, L vagy G,

K helyett R,

S helyett T és fordítva,

E helyett D és fordítva, és

Q helyett N, és fordítva.

Az aminosavszekvencia meghosszabítását tekintve, egy legfeljebb 50 aminosavból álló rövid szekvenciát adhatunk a polipeptid egyik vagy mindkét végéhez. A szekvencia előnyösen legfeljebb 30, még előnyösebben legfeljebb 20 vagy legfeljebb 10 aminosavmaradékkal lehet meghosszabítva.

A hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet egy vagy több poszttranszlációs módosításnak, például glikozilezésnek, szulfatálásnak, COOH-amidálásnak, acilezésnek vagy a polipeptid-lánc kémiai változtatásának is alávetethetjük. Így például a 63-as helyzetű Tyr-maradékot szulfatálhatjuk. A találmány szerinti eljárással előállított rekombináns hirudin vagy hirudinszerű polipeptid rendszerint nincs szulfatálva ebben a helyzetben, szemben a természetes HV1, HV2 és HV3 polipeptiddel. A találmány szerinti eljárással előállíthatók ezenkívül az alacsonyabb móltömegű származékok is, amelyek nem tartalmazzák a HV1, HV2 vagy HV3 N-terminális vagy C-terminális részét.

A találmány szerinti eljárás különösen alkalmas a HV1 vagy olyan HV1 származékok előállítására, amelyek a HV1 első 46 aminosavmaradékból és ezt követően a HV2 47-65. aminosavmaradékból állnak:

HV1:

Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-

-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln.

Hibrid HV1/HV2 (amelyet HV12-nek jelölünk):

Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-  
 -Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-  
 -Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-  
-Pro-Asn-Pro-Glu-Ser-His-Asn-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-  
-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln,

amelyben az aláhúzott szekvencia a HV2-ből származó részt jelenti. A fenti HV2 polipeptid és származékai szintén a tárlalmány tárgyát képezik.

A hirudint vagy hirudinszerű polipeptideket rekombinációs DNS-módszerrel állítjuk elő. Előállítunk egy szintetikus gént, amely a hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet kódolja. A DNS kódoló szekvencia általában nem tartalmaz intronokat. A szintetikus gént a rekombinációs termék előállítására alkalmas expressziós vektorba illesztjük. A szintetikus gént jellegzetes módon oligonukleotidok kémiai szintézisével állítjuk elő, amelyek összességükben a kívánt génnek felelnek meg. Az oligonukleotidokat összekapcsolva kapjuk a gént.

A gént négy kémiailag szintetizált oligonukleotidból állíthatjuk elő, az egyes oligonukleotidok a kettős szálú DNS gén egyik szála felének felelnek meg. Az oligonukleotidokat ligálva és illesztve kapjuk a kívánt gént. A gén-szekvenciát kívánt esetben hely-irányított mutagenézissel módosíthatjuk, egy vagy több kodoncsere kialakítása céljából. Rendszerint olyan gént szerkesztünk, amely mindkét végén restrikciós helyeket tartalmaz, hogy a további módosításokat megkönnyítsük.



A HV1-et kódoló egyik előnyös DNS-szekvencia az 1. ábrán látható. A 3. ábra mutat be egy előnyös HV12-t kódoló DNS-szekvenciát. A szekvenciát úgy is módosíthatjuk, hogy egy származékot kódoljon.

A találmány szerinti DNS-szekvencia kódolhat továbbá egy szignálpeptidet (vezető peptidet) is. A szignálpeptid képes a hirudin vagy hirudinszerű polipeptidek szekréciónját irányítani azokból a sejtekből, amelyekben a hirudin vagy hirudinszerű polipeptid kifejeződött. A szignálpeptidet kódoló szekvencia a hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet kódoló DNS-szekvencia 5'-végéhez kapcsolódik jellegzetesen.

Ha az expresszállást bakteriális gazdaszervezetben kívánjuk végrehajtani, a szignálpeptid előnyösen az OmpA szignálpeptid. Abban az esetben, ha rovarsejtekben kívánunk expresszálni, a szignálpeptid előnyösen a hólyagos szájgyulladás vírus G protein (VSV G protein) szignálpeptidje. Az OmpA és VSV G protein szignálpeptideket kódoló DNS-szekvenciák az 5., illetve 8. ábrán láthatók.

A találmány fúziós proteint kódoló DNS-szekvenciára is vonatkozik, amelyből hasítással hirudin vagy hirudinszerű polipeptid szabadul fel. Olyan DNS-szekvenciát alkalmazhatunk, amely a hirudin vagy hirudinszerű polipeptid N-terminálisához hasítható kötéssel fuzionált hordozó protein szekvenciát kódol. A hasítható kötés például bróm-ciánnal hasítható kötés lehet.

A hirudin vagy hirudinszerű polipeptid expresszállására olyan expressziós vektort szerkesztünk, amely tartalmazza a hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet kódoló DNS-

-szekvenciát, és amely megfelelő gazdaszervezetben képes a hirudin vagy hirudinszerű polipeptid expresszáására. A vektor megfelelő transzkripció és transzláció szabályozó elemeket is tartalmaz, beleértve a DNS-szekvencia promoterét, egy transzkripció terminátor helyet és a transzláció start és stop kodonokat. A DNS-szekvenciát a helyes keretben helyezzük el, amely lehetővé teszi a polipeptid expresszióját a vektorral összeférhető gazdaszervezetben.

Az expressziós vektor rendszerint egy replikációs origót, és kívánt esetben egy szelekciós jelzőgént, például egy antibiotikum-rezisztencia gént tartalmaz. Egy promoter van működőképesen kötve a hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet kódoló DNS-szekvenciához. Az expressziós vektor egy plazmid is lehet. Ebben az esetben előnyösen  $P_{trp}$  vagy  $P_{lcc/lac}$  promoter van működőképesen kötve a DNS-szekvenciához. Az expressziós vektor egy vírus is lehet. A vírus rekombináns baculovírus lehet, amelyben polihedrin promoter van működőképesen kötve a hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet kódoló DNS-szekvenciához.

A hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet expresszálni képes expressziós vektort ismert módon állíthatjuk elő. A hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet kódoló DNS-szekvenciát egy expressziós vektor, például egy plazmid vektor megfelelő restriktió helyére illeszthetjük. A rekombináns baculovírust úgy állíthatjuk elő, hogy

- (i) a hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet kódoló gént a baculovírus transzfer vektorba a polihedrin promotertől 3'-irányban lévő restriktió helyre klónozzuk,

és

- (ii) a baculovírus fertőzésre érzékeny rovarsejteket az (i) lépés szerinti rekombináns transzfer vektorral és az érintetlen, vad-típusú baculovírus DNS-sel együtt transzfektáljuk.

Homológ rekombináció játszódik le, amelynek eredményeként olyan rekombináns baculovírust kapunk, amely a hirudin gént vagy a hirudinszerű polipeptidet kódoló gént a polihedrin promotertől 3'-irányban tartalmazza. A baculovírus transzfer vektor egy olyan vektor lehet, amely egyetlen klónozó helyet tartalmaz a polihedrin ATG start kodontól 3'-irányban. A kapott rekombináns baculovírus által expresszált termék egy fúziós protein lesz, amelyben a polihedrin protein N-terminális része van a hirudin vagy hirudinszerű polipeptid N-terminálisához fuzionálva. Mint azt fent említettük, a fúziós csatlakozás egy hasítható kötéssel jöhet létre.

A (ii) lépésben alkalmazott rovarsejt előnyösen *Spo-doptera frugiperda* sejt lehet. Vad-típusú baculovírusként előnyösen *Autographa californica* mag polihedrozis vírust (AcNPV) alkalmazunk.

A hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet kódoló expressziós vektort megfelelő gazdaszervezetbe visszük be. A transzformált gazdát olyan körülmények között állítjuk elő, amelyek között a hirudin vagy hirudinszerű polipeptid abban expresszálódni képes. A transzformált sejteket például olyan körülmények között tenyésztjük, amelyek között az expresszió végbemehet. Bármely kompatibilis gazda-vektor rendszer alkalmazható.

A transzformált gazdaszervezet prokariota vagy eukariota lehet. Bakteriális vagy élesztő gazdaszervezetet alkalmazhatunk, például *E. colit* vagy *S. cerevisiae*t. Gram-pozitív baktériumokat is alkalmazhatunk. Előnyös bakteriális gazda lehet egy B-típusú *E. coli* törzs. Rovarsejteket is alkalmazhatunk, ebben az esetben egy baculovírus expressziós rendszer a megfelelő. A rovarsejt rendszerint Sprodoptera frugiperda sejt lehet. További lehetőségként emlős sejt vonalak is transzformálhatók. Előállíthatunk egy transzgén állatot is, például valamely emlős állatot, amelyben hirudin vagy hirudinszerű polipeptid termelődik. Az expresszált hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet ezután izolálhatjuk és tisztíthatjuk.

A találmány szerinti eljárással előállított hirudin vagy hirudinszerű polipeptid gyógyászati lag elfogadható hordozóanyagokkal vagy egyéb segédanyagokkal összekeverve gyógyászati készítmények hatóanyagaként alkalmazható. A fenti készítmények rendszerint intravénás adagolásra alkalmas készítmények lehetnek (ebben az esetben a hordozóanyag általában steril sóoldat vagy megfelelő tisztaságú víz). A találmány szerinti eljárással előállított hirudin és hirudinszerű polipeptidek antitrombin-aktivitással rendelkeznek, ennek következtében tromboembóliák, például vérkoagulálás kezelésére alkalmazhatók, különösen a humán gyógyászatban. A találmány egy megvalósítási módja szerint a hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet valamely plazminogén-aktivátorral, például szöveti plazminogén-aktivátorral együtt adagoljuk a kezelendő betegnek. A találmány szerinti eljárással előállí-

tott hirudin és hirudinszerű polipeptidek tapasztalataink szerint összeférhetőek az utóbbi hatóanyagokkal.

A találmányt közelebbről az alábbi példákkal kívánjuk ismertetni.

A mellékelt ábrák jelentése az alábbi.

Az 1. ábra a HV1 hirudin lánc legnagyobb részét kódoló négy oligonukleotid szekvenciáját mutatja. Az aláhúzott szekvencia mutatja a BalI helyet, amelyet a további szerkesztésekben alkalmaztunk. Az ábra alsó része mutatja a négy oligonukleotid összekapcsolásának módját. A szekvencia tartalmazza a további műveletekhez szükséges HindIII és PstI helyeket.

A 2. ábra mutatja az M13-HV1 intermedier plazmid szerkesztésének vázlatát, amely az összes további szerkesztéshez alkalmazott BalI-BamHI DNS-fragmens forrása.

A 3. ábrán látható a HV12 hirudin lánc legnagyobb részét kódoló négy oligonukleotid szekvenciája. Az aláhúzott szekvencia jelöli a BalI helyet, amelyet a további szerkesztésekben alkalmaztunk. Az ábra alsó része mutatja a négy oligonukleotid összekapcsolásának módját. A szekvencia tartalmazza a további műveletekhez szükséges HindIII és PstI helyeket.

A 4. ábra mutatja az M13-HV12 intermedier plazmid szerkesztésének vázlatát, amely az összes további szerkesztéshez alkalmazott BalI-BamHI DNS-fragmens forrása.

Az 5. ábra mutatja sematikusan az új rekombináns M13 plazmidok, mégpedig az OMP-HV1 és OMP-HV12 szerkezetét, amelyek a teljes HV1 illetve teljes HV12 gént tartalmazzák

az OmpA szignálpeptidhez kötve. A szignálpeptid szekvenciáját kétszer aláhúztuk, míg egyszeres aláhúzással jelöltük a BalI tompa véget és a HindIII tapadós véget.

A 6. ábra mutatja sematikusán a pFC-HV1 és pFC-HV12 plazmidok szerkezetét, amelyeket a HV1 és HV12 előállítására használtunk *E. coliban*.

A 7. ábrán látható az *E. coliban* hirudin előállítására használt pOMP-HV1 plazmid általános szerkezete. A fenti új plazmidot a szokásos géntechnológiai módszerekkel állítottuk elő, a plazmidban a hirudin gén a P<sub>1pp/lac</sub> hibrid promoter transzkripció szabályozása alatt áll. Még ebben az esetben is az OmpA szignálszekvencia segíti elő a hirudin szekrécióját az *E. coli* periplazmájába.

A 8. ábra mutatja a hirudin rovarsejtekben való kifejezésére használt nukleotidszekvenciát és a szintetikus oligonukleotidok kapcsolódását. Az aláhúzott szekvencia a VSV G protein szignálpeptidet jelöli.

A 9. ábra a VSV-HV12 nevű új rekombináns M13 szerkezetének sematikus ábrázolása, amelyben a teljes gén a VSV G protein szignálpeptidhez van kötve.

A 10. ábra mutatja sematikusán baculovírus genomhoz transzfer vektorként használt pAC-HV12 szerkezetét. A pAcYM1 a kiindulási plazmid, amelyet elterjedten használnak a vírusba bevinni kívánt heterológ szekvencia akceptoraként.

A 11. ábrán látható a hirudin lánc kezdeti szakaszát kódoló szintetikus oligonukleotidok szekvenciája és azok kapcsolódása. A pótlólagos metionin-maradékot kódoló ATG kodont aláhúztuk.

A 12. ábra mutatja sematikusan a hirudin intracelluláris expresszáására használt pAcFT1 szerkezetét.

A 13. ábrán látható két új transzfer plazmid, a pAcFT1-HV1 és pAcFT1-HV12 sematikus szerkezete, amelyek a teljes HV1 illetve HV12 szekvenciát hordozzák a polihedrin első 18 aminosavjához kötve. A fenti plazmidokat a heterológ szekvencia baculovírus genomba való bevitelére alkalmaztuk.

### 1. példa

#### **HV1 és HV12 gének kémiai szintézise**

A kódoló nukleotidszekvenciákat az *E. coli* előnyös kodonjai alapján terveztük meg [Grosjeans H. és Fiers W., *Gene* 18, 199 (1982)]. Ezenkívül beépítettünk egy BalI restrikciós helyet a szintetikus szekvencia 5'-végének közelében, amely lehetővé teszi a kódoló szekvenciák inszercióját a különböző expressziós vektorokba. Ténylegesen azonos szintetikus géneket alkalmaztunk a bakteriális és a rovarsejtekben való expresszáásra. Rovarsejtek alkalmazása esetén olyan módszereket fejlesztettünk ki, amelyek szekretált vagy citoplazmatikus termékeket eredményeztek.

A plazmid DNS-sel végzett összes műveletet a Maniatis és munkatársai által ismertetett módon hajtottuk végre [Maniatis T., Fritsch E.F. és Sambrook J., 1982, Cold Spring Harbor, NY].

A HV1 gént az alábbiak szerint szintetizáltuk és kapcsoltuk össze. Automatizált DNS szintetizátorral (Applied Biosystems) négy komplementer oligonukleotidot szintetizáltunk, amelyek szekvenciáját az 1. ábra mutatja. Enzimatis foszforilezés után a négy oligonukleotidot DNS-ligáz

alkalmazásával összekapcsoltuk és a kapott kettős szálú szekvenciát a M13mp18 fág vektorba illesztettük. A kapott M13-HV1 rekombináns plazmidot a 2. ábra mutatja. Annak érdekében, hogy a hirudin gént is beépíthessük az M13 vektorba, a szintetikus oligonukleotidokban HindIII és PstI helyeket is kialakítottunk. A nukleotidszekvencia helyességét Sanger módszerével igazoltuk [Sanger F., Nicklen S. és Coulson A. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)], egyszálú fág DNS-en.

Az M13-HV1 rekombináns plazmidot alkalmaztuk a HV1 gén forrásaként minden expressziós vektorban, amelyet a példákban használtunk.

A HV12 gént hasonló módon szintetizáltuk és kapcsoltuk össze. A gén előállítására használt oligonukleotidok szekvenciáját a 3. ábra mutatja. A 3. és 4. oligonukleotid más aminosavakat kódol, mint az 1. ábrán látható 3. és 4. oligonukleotid. A kapott M13-HV12 rekombináns plazmid a 4. ábrán látható.

## 2. példa

### **Hirudin expressziója és szekréciója E. coliból**

Annak érdekében, hogy a rekombináns termék a periplazmába választódjon ki, a HV1 és HV12 molekulákat pre-protein formájában kell szintetizálni. Közelebbről, a HV1 vagy HV12 amino-terminálisán jelen kell lennie egy szignálpeptidnek nevezett aminosavszekvenciának, amely a megfelelő szekréciót biztosítja [Blobel G. és Dobberstein B., J. Cell Biology, 67, 83 (1975); és Pages J.M., Biochimie, 65, 531 (1983)]. Ezt a többlet-szekvenciát azután az in vivo szekré-



ció folyamán egy specifikus E. coli szignál-peptidáz lehasítja, így keletkezik a tökéletes, érett szekvencia [Wolfe P.B., J. Biol. Chem. 258, 12073 (1983)].

A szakirodalomból számos szekréción rendszer ismert [Talmadge K., Stahl S. és Gilbert W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3369 (1980); Oka T., Sakamoto S., Miyoshi K., Fuwa T., Yoda K., Yamasaki M., Tamura G. és Miyake K., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7212 (1985)]. Ezek közül választottuk ki az E. coli külső membrán proteinjén alapuló, ismert rendszert (Omp A) [Henning V., Royer H.D., Teather R.M., Hindennach I. és Hollenberg C.P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4360 (1979)]. Ezért két további komplementer oligonukleotidot terveztünk, amelyek az OmpA szignálpeptidet és az azt megelőző OmpA Shine-Dalgarno szekvenciát kódolják, az utóbbi ismert módon a messenger RNS megfelelő transzlációjáért felelős [Isacchi A., Sarmientos P., Lorenzetti R. és Soria M., Gene 81, 129 (1989)].

Ezek a szekvenciák - amelyek az 5. ábrán láthatók - a HV1 gén kezdeti, első 10 aminosavat kódoló szakaszát is magukban foglalják. A BalI hely jelenléte biztosítja a fenti szintetikus szakasz kapcsolódását a HV1 kódoló szekvencia többi részéhez, míg az 5'-irányban lévő HindIII hely jelenléte lehetővé teszi az M13 vektorhoz való kapcsolódást. Így a szintetikus HindIII-BalI fragmenst az M13-HV1-ből származó BalI-BamHI szakaszhoz ligáltuk és az M13mpl8-ba illesztettük, így kaptuk az OMP-HV1-nek nevezett új plazmidot. A fenti új plazmid szerkesztését vázlatosan az 5. ábra is mutatja. M13-HV12-ből kiindulva, hasonló módon eljárva kapjuk az

OMP-HV12-t (5. ábra).

Az OMP-HV1-ből a hirudin gént HindIII-BamHI fragmensként kivághatjuk, ez a fragmens kódolja a OmpA Shine-Dalgarno és szignálpeptidet, amelyet a hirudin kódoló szekvenciája követ. Ezt a restriktív fragmentumot ezután megfelelő expressziós vektorba illeszthetjük. Elméletileg számos expressziós rendszert alkalmazhatunk heterológ proteinek nagy koncentrációban való expresszáására baktériumokban. A  $P_{trp}$  promoteren alapuló rendszert már sikeresen alkalmaztuk laboratóriumunkban [Isacchi A., Sarmientos P., Lorenzetti R. és Soria M., *Gene* 81, 129 (1989)]. Azonban még a kiválasztott promoter esetében sem lehet előre megjósolni az adott polipeptid expressziójának mértékét. A  $P_{trp}$  promoter alkalmazását a hirudin expresszáására eddig még sehol nem ismertették.

A pFC33 plazmid - amelyet a 6. ábra mutat - a szakirodalomból ismert [Isacchi A., Sarmientos P., Lorenzetti R. és Soria M., *Gene* 81, 129 (1989)]. Ez hordozza az ampicillin antibiotikummal szembeni rezisztenciát és a  $P_{trp}$  bakteriális promotert, amely a proapolipoprotein A1 expresszióját segíti elő. A pFC33-at HindIII-mal és BamHI-vel emésztettük, majd izoláltuk az antibiotikum-rezisztencia gént és a promotert hordozó nagy HindIII-BamHI fragmenst, amelyet a HV1 hirudint, illetve HV12 hirudinszármazékot kódoló, OMP-HV1-ből, illetve OMP-HV12-ből származó HindIII-BamHI fragmenssel kapcsolunk össze. A fenti szerkesztést részletesen a 6. ábra mutatja. A pFC-HV1-nek, illetve pFC-HV12-nek nevezett új plazmidokat izoláltuk, és ezeket a plazmidokat alkalmaztuk a

HV1, illetve HV12 expresszálasára *E. coli*-ban.

A találmány fontos szempontja a B-típusú *E. coli* törzsek alkalmazása a hirudin és származékai expresszálasára és periplazmába való kiválasztására. Ténylegesen azt tapasztaltuk, hogy a pFC-HV1 plazmid B-típusú *E. coli* baktérium-törzsekbe való bevitelével a hirudin nagy koncentrációban előállítható. Meglepő módon más típusú *E. coli* törzsek nem képesek ilyen nagymértékű expresszióra, ezért úgy tűnik, hogy a gazda törzs típusa kritikus a hirudin nagy hozammal való előállítására szempontjából.

A hirudin és hirudinszerű polipeptidek előállítására számos B-típusú *E. coli* törzs alkalmazható. Előnyös törzs az ATCC 12407, ATCC 11303 és NCTC 10537. Alább példaszerűen ismertetjük az NCTC 10537 törzs transzformálását a pFC-HV1 plazmiddal, és ezt követően a transzformáns tenyésztését.

Az *E. coli* NCTC 10537 törzsből Mandel és Higa kalcium-kloridos eljárása szerint állítunk elő kompetens sejteket [Mandel M. és Higa A.J., *J. Mol. Biology*, 53, 154 (1970)]. Mintegy 200  $\mu$ l így kapott sejtkészítményt ( $1 \times 10^9$  sejt/ml) 2  $\mu$ l, mintegy 5  $\mu$ g/ml koncentrációjú plazmid DNS-sel transzformálunk. A transzformánsokat 100  $\mu$ g/ml ampicillint tartalmazó L-agaros lemezen szelektáljuk. Ugyanezen antibiotikumot tartalmazó L-agar lemezre két kis telepet fából készült fogvájópálcikákkal kioltunk (mindegyikből három, mintegy 1 cm hosszú csíkot). A lemezt 37 °C-on 12 órán keresztül inkubáljuk, majd a csíkok egy részéből meghatározzuk a hirudintermelést oly módon, hogy 10 ml, 150  $\mu$ g/ml ampicillint tartalmazó LB tápközegbe oltjuk és 37 °C-on egy éjsza-

kán keresztül inkubáljuk. A következő napon a tenyészetet 1:100 arányban azonos koncentrációban ampicillint tartalmazó M9 tápközeggel hígítjuk és 37 °C-on 6 órán keresztül inkubáljuk.

Az egyes tenyészetek 20 ml-ét 4 °C-on 12000xg-vel 10 percen keresztül centrifugáljuk. A baktériumüledéket 2 ml 33 mmól/l koncentrációjú HCl-Tris pufferben (pH 8) szuszpendáljuk; ezután azonos térfogatban 33 mmól/l EDTA-t és 40 % szacharózt tartalmazó oldatot adunk hozzá és enyhe rázás közben 37 °C-on 10 percen keresztül inkubáljuk. A centrifugálást követően a permeábilissá tett sejteket 2 ml hideg vízben felszuszpendáljuk és 10 percen keresztül jégen tartjuk. A centrifugálással elválasztott felülúszó a baktériumsejtek periplazma-frakciója.

Kromogén vizsgálatot alkalmazva - amely a trombin szintetikus S-2238 szubsztrátot hasító képességének gátlásán alapul [Krstenansky J.K. és Mao S.T.J., FEBS Lett. 211, 10 (1987)] - meghatározzuk a hirudint termelő sejtek periplazma-frakciójában az antitrombin-aktivitást. Ezekben a mintákban a hirudin-aktivitás mintegy 50 µg/ml koncentrációban van jelen. Ez az aktivitás hiányzik a kontroll preriplazma-frakciókból. A pFC-HV12 esetében a HV12 hirudin hozama 80 µg/ml hirudinnal felel meg.

Hasonló elvek alapján a hirudin számára is szerkesztettünk egy új expressziós/szekrécións plazmidot, amelyben P<sub>trp</sub> promoter helyett P<sub>lpp/lac</sub> promoter van [Ghrayeb J., Kimura H., Takahara M., Hsiung H., Masui Y. és Inouye M., EMBO Journal 3, 2437 (1984)]. Ezt a pOMP-HV1-nek nevezett plazmi-

dot a 7.. ábrán mutatjuk be. A fenti plazmidot B-típusú E. coli törzsekbe bevíve, nagy koncentrációban (40-80  $\mu\text{g/ml}$ ) kaptunk aktív hirudint. A pOMP-HV1 szerkesztésére kiindulási plazmidként pIN-III-ompA3 plazmidot [Ghrayeb J., Kimura H., Takahara M., Hsiung H., Masui Y. és Inouye M., EMBO Journal 3, 2437 (1984)] alkalmaztunk. A tenyésztést és az expresszió indukálását izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) szintén a fenti irodalmi helyen leírtak szerint végeztük.

### 3. példa

#### **E. coliból kapott rekombináns HV1 antikoaguláns aktivitása**

A HV1 hirudin antikoaguláns aktivitását az aktivált részleges tromboplastin idő (aPTT) és trombin idő (T.T.) meghatározásával is megvizsgáltuk. Mindkét vizsgálatban automatizált koagulométert (ACL300 Research, Instrumentation Laboratory, Milánó, Olaszország) használtunk.

Normál, citrátos plazmához növekvő koncentrációban adtuk a rekombináns HV1 hirudint. A mintákat ezután automatizált koagulométerrel vizsgáltuk, amely képes az aPTT és T.T. automatikus meghatározására, oly módon, hogy a plazmához automatikusan adagolja a megfelelő reagenseket és feljegyzi a vérrög képződésének sebességét. Az aPTT-t kefalín és kalcium-klorid (automata aPTT reagens, General Diagnostic, USA), a T.T.-t 5 NE/ml humán trombin (Fibrindex, Ortho Diagnostic, Milánó, Olaszország) alkalmazásával határoztuk meg. A reagenseket a gyártó útmutatásának megfelelően készítettük el, tároltuk és alkalmaztuk.

Az aPTT és T.T. vizsgálatokban kapott alvadási idő-

ket a rekombináns protein koncentrációjának függvényében ábrázoltuk. Mindkét vizsgálat esetében kiszámítottuk azt a koncentrációt, amelynek jelenlétében az alvadási idő a normál plazma alvadási idejéhez képest megkétszereződik. Az aPTT vizsgálatban kapott érték 210 ng/ml, míg a T.T. vizsgálatban 90 ng/ml.

#### 4. példa

##### **HV12 expressziója és szekréciója rovarsejtekben**

A HV12 rekombináns rovarsejtekből való szekréciójának biztosítására a HV12 kódoló szekvenciát egy szignálpeptidhez kell kötni, amelyet ezek a sejtek képesek kielégítően felismerni. A hólyaghos szájgyulladás vírus (VSV) G protein szignálpeptidjét [Bailey M.J., McLeod D.A., Kang C. és Bishop D.H.L., *Virology* 169, 323 (1989)] használtuk erre a célra. A fenti szekvencia alkalmazása hirudin vagy származékai előállítására rovarsejtekben a szakirodalomból nem volt ismert. A fentiekben ismertetett módon előállítottunk egy VSV G protein szignálpeptidet kódoló szintetikus DNS-szekvenciát, amelyhez hozzákapcsoltuk a HV12 gén kezdetét, a fenti nukleotidszekvenciát a 8. ábra mutatja. Ebben az esetben megfelelő restrikciós helyeket (HindIII, BamHI és BalI) is kialakítottunk, a HV12 gén további része és az expressziós vektor kapcsolódásának biztosítására.

A szintetikus HindIII-BalI fragmenst a HV12 gént hordozó M13-HV12-ből származó tisztított BalI-BamHI fragmenshez kapcsoljuk, és előzetesen HindIII-mal és BamHI-gyel hasított M13mp18-ba illesztjük. Az így kapott új plazmidot - amelyet sematikusán a 9. ábrán ábrázolunk - VSV-HV12-nek

nevezzük. A VSV-HV12-ből kivágjuk a HV12 gént VSV szignál-peptidhez kapcsolva tartalmazó BamHI-BamHI fragmenst, és a pAcYM1 vektorba [Matsuura Y., Possee R.D., Overton H.A. és Bishop D.H.L., J. Gen. Virol. 68, 1233 (1987)] illesztjük (10. ábra). A kapott plazmidot pAc-HV12-nek nevezzük.

Rovarsejtekben való expresszió biztosítására a VSV-HV12 kódoló szekvenciát polihedrin promoter transzkripció szabályozása alatti baculovírus genomba kell transzformálni. Ebből a célból a rovarsejteket vad típusú baculovírus DNS-sel és pAc-HV12 transzfer vektorral egyidejűleg transzfektáltuk. Rovarsejtként Spodoptera frugiperda gazdasejteket alkalmaztunk. A kísérleti körülmények az alábbiak.

S. frugiperda sejteket fertőzőképes AcNPV-DNS és az egyes rekombináns transzfer vektorokat képviselő plazmid DNS elegyével transzfektáljuk, Summers és munkatársai [Summers M.D. és Smith G.E., Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)] módszerének módosításával. 1  $\mu\text{g}$  virális DNS-t 25-100  $\mu\text{g}$  plazmid-DNS-sel elegyítünk, és 0,125 mól/l kalcium-kloriddal kicsapjuk 20 mmól/l HEPES-puffer (pH 7,5), 1 mmól/l dinátrium-hidrogén-ortofoszfát, 5 mmól/l kálium-klorid, 140 mmól/l nátrium-klorid és 10 mmól/l glükóz (végkoncentrációk) jelenlétében, 1 ml végtérfogatban.

A DNS-szuszpenziót 35 mm-es tenyésztőcsészében  $10^6$  S. frugiperda sejtet tartalmazó egysejtrétegre oltjuk, a sejteket szobahőmérsékleten 1 órán keresztül adszorbeálódni hagyjuk, majd 1 ml tápközeggel helyettesítjük. 28 °C-on 3 napon keresztül végzett inkubálás után a felülúszó folyadékot összegyűjtjük és S. frugiperda egysejtrétegen plakkok

képzésére alkalmazzuk. A rekombináns vírust tartalmazó plakkokat fénymikroszkópos vizsgálattal különböztetjük meg azáltal, hogy nincs polihedrinjük. Az ilyen plakkokból származó vírust kinyerjük és további plakk-tisztítás után polihedrin-negatív vírus-tenyészetek előállítására használjuk.

A fenti eljárással sikerült olyan rekombináns baculovírust izolálnunk, amelynek genomja a HV12 gént a polihedrin promoter és a VSV G protein szignálpeptid kontrollja alatt hordozza. A fenti vírust alkalmaztuk *S. frugiperda* sejtek fertőzésére, ismert módon [Summers M.D. és Smith G.E., Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)], 10-szeres fertőzéssel. A fertőzött sejteket ezután pörgetett tenyészetben vagy egyrétegben tenyésztjük, 10 % magzati borjúsérum jelenlétében [Summers M.D. és Smith G.E., Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)]. A fertőzés után bizonyos időközökben a felülúszóban mérjük az antitrombin-aktivitást (ATU), S-2238 kromogén vizsgálati módszer alkalmazásával. Az eredményeket az alábbi táblázatban foglaljuk össze.

Táblázat: Hirudin aktivitás (ATU/10<sup>6</sup> sejt)

	Fertőzés után eltelt idő			
	0 óra	24 óra	48 óra	72 óra
pörgetett tenyészet	0,8	0,9	1,4	1,8
egyréteges tenyészet	0,8	0,8	2,0	5,1



5. példa

**HV1 és HV12 expressziója rovarsejtek citoplazmájában**

A hirudint és hirudinszármazékokat *S. frugiperda* sejtek citoplazmájában is elő lehet állítani és dúsítani. Ezzel a módszerrel általában jobb hozamot lehet elérni heterológ proteinek esetében, mivel egy nem-szekretált virális protein, a polihedrin expressziós jeleit hasznosítjuk.

A találmány szerinti megoldás értelmében a rekombináns HV1 és HV12 nagy mennyiségeinek előállítására olyan fúziós proteint expresszálunk, amelyben a polihedrin első 18 aminosavja van a HV1 vagy HV12 65 aminosavjához kapcsolva. A polihedrin amino-terminális szekvenciájának jelenléte magas szintű expressziót biztosít [Luckow V.A: és Summers M.D., *Virology* 167, 56 (1988)]. Ezenkívül, a polihedrin-rész és a HV1 vagy HV12 szekvencia közé egy metioninmaradékot is beépítettünk, amely lehetővé teszi a HV1 vagy HV12 maradék felszabadulását, ha a hibrid proteint bróm-ciánnal kezeljük.

Az előző megoldásokhoz hasonlóan előállítunk egy olyan szintetikus DNS-fragmenst, amely lehetővé teszi az M13-HV1-ből vagy M13-HV12-ből származó BalI-BamHI fragmens megfelelő transzfer vektorhoz való kapcsolását. Az új szintetikus szekvencia - amely a 11. ábrán látható - egy BamHI és egy BalI helyet is tartalmaz a soronkövetkező műveletekhez.

Előállítottunk egy eltérő transzfer vektort, a pAcFT1 vektort, amely a polihedrin első 18 aminosavját kódoló nukleotidszekvenciát tartalmazza (12. ábra). Röviden, a pACYM1 [Matsuura Y., Possee R.D., Overton H.A. és Bishop D. H.L., *J. Gen. Virol.* 68, 1233 (1987)] EcoRV-BamHI fragmensét

egy szintetikus oligonukleotiddal helyettesítettük, amely a polihedrin gén szekvenciájából a -92. nukleotidtól a +55. nukleotidig terjedő szakaszt tartalmazza. Ez után a szekven-  
cia után egy megfelelő BamHI hely van, amelyet a teljes HV1  
vagy HV12 kódoló szekvencia inszertálására használunk fel,  
a 13. ábra szerint. Ezzel a konstrukcióval két új - pAcFT1-  
-HV1-nek, illetve pAcFT1-HV12-nek nevezett - plazmidot ka-  
punk, amelyeket a hibrid gének baculovírusba való bevitelére  
alkalmazunk.

A rekombináns baculovírusokat a 4. példában ismerte-  
tett módon állítjuk elő. A *S. frugiperda* sejtek fertőzését  
ismert módon végezzük [Summers M.D. és Smith G.E., Texas  
Agricultural Experiment Station Bulletin No 1555 (1987)]. A  
fertőzött rovarsejtek tenyésztése során a citoplazmában fel-  
halmozódik a fúziós protein. Ez a hibrid protein a forrása  
a rekombináns HV1-nek vagy HV12-nek. A szakirodalomból szá-  
mos eljárás ismert, amely a hibrid protein bróm-ciános hasí-  
tására alkalmazható [Gross E., *Methods in Enzymology*, 11,  
238 (1967); Olson H., Lind P., Pohl G., Henrichson C., Mutt  
V., Jornvall H., Josephson S., Uhlen M. és Lake M., *Peptides*  
9, 301 (1987)]. Olson és munkatársai módszerének [Peptides  
9, 301 (1987)] alkalmazásával sikerült a helyes polipeptid-  
-szekvenciájú HV1-et illetve HV12-t előállítani. Mindkét  
molekula antitrombin-aktivitással rendelkezik.

## S z a b a d a l m i   i g é n y p o n t o k

1. Expressziós vektor, amely hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz.
2. Az 1. igénypont szerinti vektor, amely egy plazmid.
3. A 2. igénypont szerinti vektor, amelyben egy  $P_{trp}$  vagy  $P_{lpp/lac}$  promoter van működőképesen kötve a DNS-szekvenciához.
4. Az 1. igénypont szerinti vektor, amely egy vírus.
5. A 4. igénypont szerinti vektor, amelyben a vírus egy rekombináns baculovírus, amelyben a polihedrin promoter van működőképesen kötve a DNS-szekvenciához.
6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti vektor, amelyben a DNS-szekvencia egy szignálpeptidet is kódol, amely a hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet expresszáló sejtekből a hirudin vagy hirudinszerű polipeptid szekréciónak irányítani képes.
7. A 6. igénypont szerinti vektor, amelyben a szignálpeptid OmpA vagy VSV G protein szignálpeptid.
8. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti vektor, amelyben a DNS-szekvencia egy fúziós proteint kódol, amelynek hasításával a hirudin vagy hirudinszerű polipeptid szabadbá válik.
9. Az 5. igénypont szerinti vektor, amelyben a DNS-szekvencia egy fúziós proteint kódol, amelynek hasításával

a hirudin vagy hirudinszerű polipeptid szabaddá válik, amely fúziós protein a polihedrin protein N-terminális szakaszát tartalmazza hasítható kötéssel a hirudin vagy hirudinszerű polipeptid N-terminálisához kötve.

10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti expressziós vektor, amelyben a hirudin vagy hirudinszerű polipeptid az alábbi:

HV1

Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-  
-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-  
-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-  
-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-  
-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln,

vagy HV12:

Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-  
-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-  
-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-  
-Pro-Asn-Pro-Glu-Ser-His-Asn-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-  
-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln,

amelyben az aláhúzott szakasz a HV2-ből származó rész.

11. Gazda, amely az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti kompatibilis expressziós vektorral van transzformálva.

12. A 11. igénypont szerinti gazda, amely egy baktérium.

13. A 12. igénypont szerinti gazda, amely egy B-típusú E. coli. törzs.

14. A 11. igénypont szerinti gazda, amely egy

eukariota gazda, amelyet élesztő, emlős sejtvonal, rovar-sejtvonal és állat közül választunk.

15. A 14. igénypont szerinti gazda, amely Spodoptera frugiperda sejtvonal.

16. Szintetikus DNS, amely hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet kódol.

17. A 16. igénypont szerinti DNS, amely továbbá egy szignálpeptidet is kódol, amely a hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet expresszáló sejtekből a hirudin vagy hirudinszerű polipeptid szekrécióját irányítani képes.

18. A 17. igénypont szerinti DNS, amelyben a szignálpeptidet kódoló szekvencia az OmpA-t vagy VSV G proteint kódoló szekvencia.

19. A 16. igénypont szerinti DNS, amelyben a DNS-szekvencia egy fúziós proteint kódol, amelynek hasításával a hirudin vagy hirudinszerű polipeptid szabaddá válik.

20. A 16-19. igénypontok bármelyike szerinti DNS, amely hirudinként vagy hirudinszerű polipeptidként a 10. igénypont szerinti HV1-t vagy HV12-t kódolja.

21. Eljárás hirudin vagy hirudinszerű polipeptid előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy egy, a 11-15. igénypontok bármelyike szerinti gazdát a hirudin vagy hirudinszerű polipeptid expresszálására alkalmas körülmények közé helyezünk.

22. Eljárás hirudin vagy hirudinszerű polipeptid expresszálására képes gazda előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy egy gazdát az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti kompatibilis expressziós vektorral

transzformálunk.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az expressziós vektort úgy állítjuk elő, hogy

(a) kémiaailag szintetizálunk egy hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet kódoló DNS-t, és

(b) a DNS-t expressziós vektorba illesztjük.

24. A 10. igénypont szerinti HV12 polipeptid, vagy annak származéka.

25. Gyógyászati készítmény, amely gyógyászatilag elfogadható hordozóanyag vagy hígítóanyag mellett hatóanyagként egy 21. igénypont szerinti eljárással előállított hirudint vagy hirudinszerű polipeptidet vagy egy 24. igénypont szerinti polipeptidet tartalmaz.

*29 oldal + 13 oldal*

*[Handwritten signature]*

A meghatalmazott:

DANUBIA  
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.  
6.  
*[Handwritten signature]*

Aktaszámunk: 73954-3527-SI

Ügyintézőnk: dr. Kiss Ildikó

**ÖZÉTELEI  
ELDÁNY**

88/02

13/1

59961

**1. ÁBRA**

oligo 1 HV1

5' AGCTTTGGCCAGAACCTGTGCCTGTGGGAAGGTTCTAACGTTTGGGGTCAGGGTAACAAATGCATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAAGAACC 3'

oligo 2 HV1

5' ACTGGTCTTTTACCGTTCAGAACCCAGGATGCATTTGTTACCCGTGACCGCAAACGTTAGAACCTTCGCACAGGECACAGGTTCTGGCCAA 3'

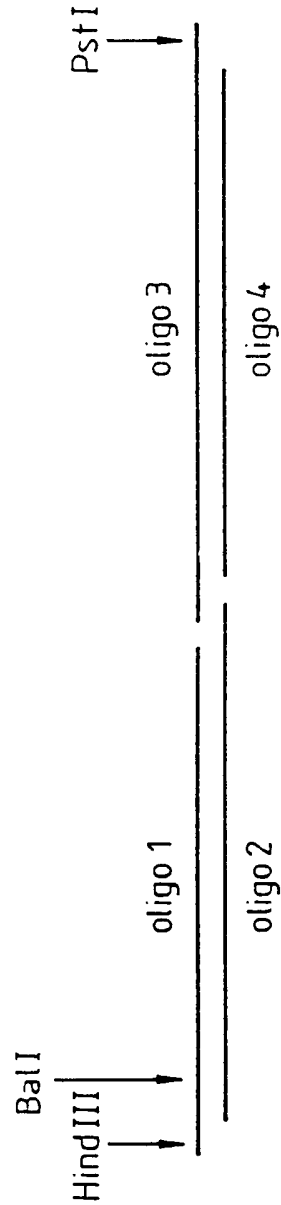
oligo 3 HV1

5' AGTGGTTACCGGTGAAGGTACCGGAAACCGCAGTCTCACACGACGGTGACTTCGAAGAAATCCCGGAAGAATACCTGCAATAGTAAC TGCA 3'

oligo 4 HV1

5' GTTACTATGCAGGTATCTTGGGGGATTTCTTCGAAGTCACCGTCGTTGTGAGACTGGGTTTCGGGGTACCTTCACCGGTAACGC 3'

KAPCSOLÁS:

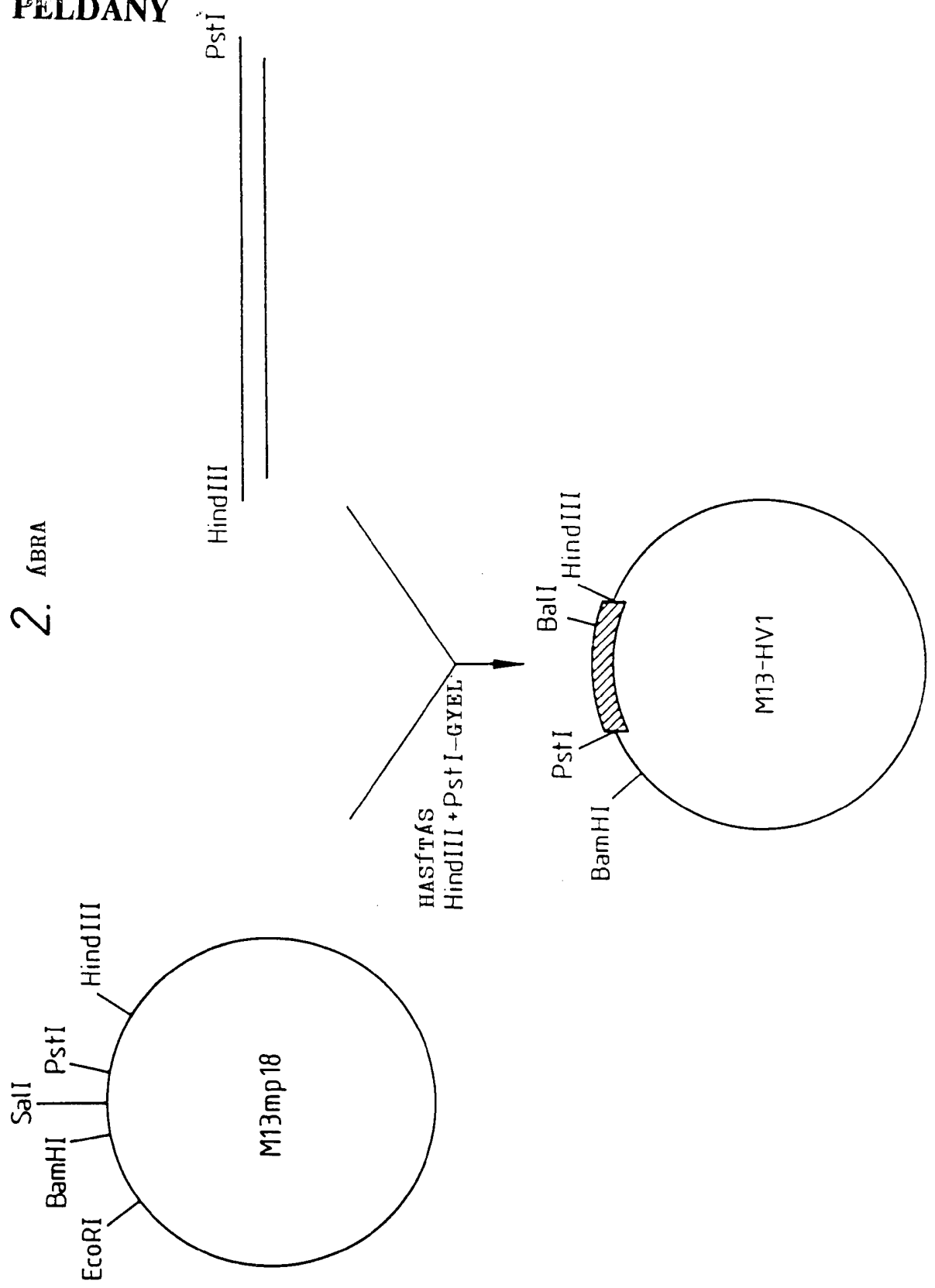


6  
*[Handwritten signatures]*

# FÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

88/02

2. ÁBRA

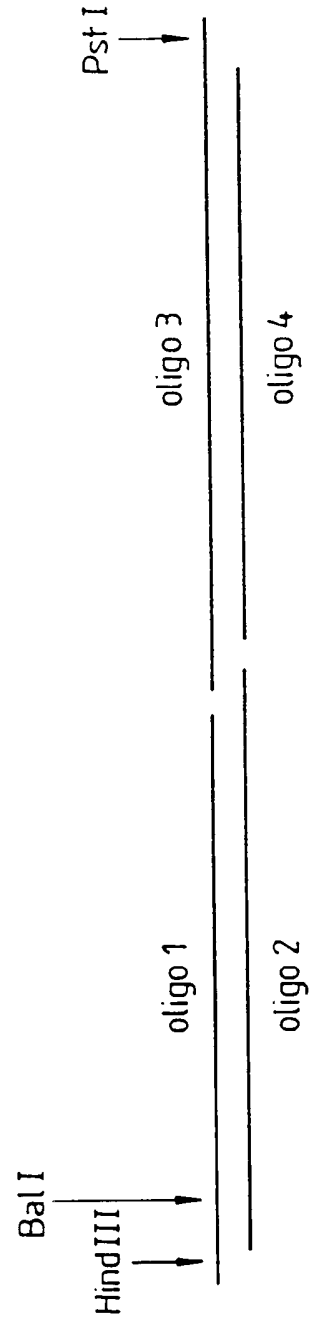




3. ÁBRA

- oligo 1 HV12  
5' AGCTTTGGCCAGAACCTGTGCCTGTGGGAAGGTTCTAACGTTTGGGGTCAGGGTAACAATGCATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAGAACC 3'
- oligo 2 HV12  
5' ACTGGTCTTTTCAACCGTCAGAACCCAGGATGCATTGTTACCCCTGACCCGCAACCGTTAGAACCTTCGCACAGGCCACAGGTTCTGGCCAA 3'
- oligo 3 HV12  
5' AGTGGTTACCGGTGAAGGTACCCCGAACCCCTGAAAGCCATAATAACGGGATTCGAAGAAATCCAGAAGAATATTTACAATGAACCTGCA 3'
- oligo 4 HV12  
5' GTTCATTGTAATATCTTCTGGAAATTTCTTCGAAATCGCCGTTATTATGGCTTTCAGGGTTCGGGGTACCCTTCACCCGGTAACGC 3'

KAPCSOLÁS:



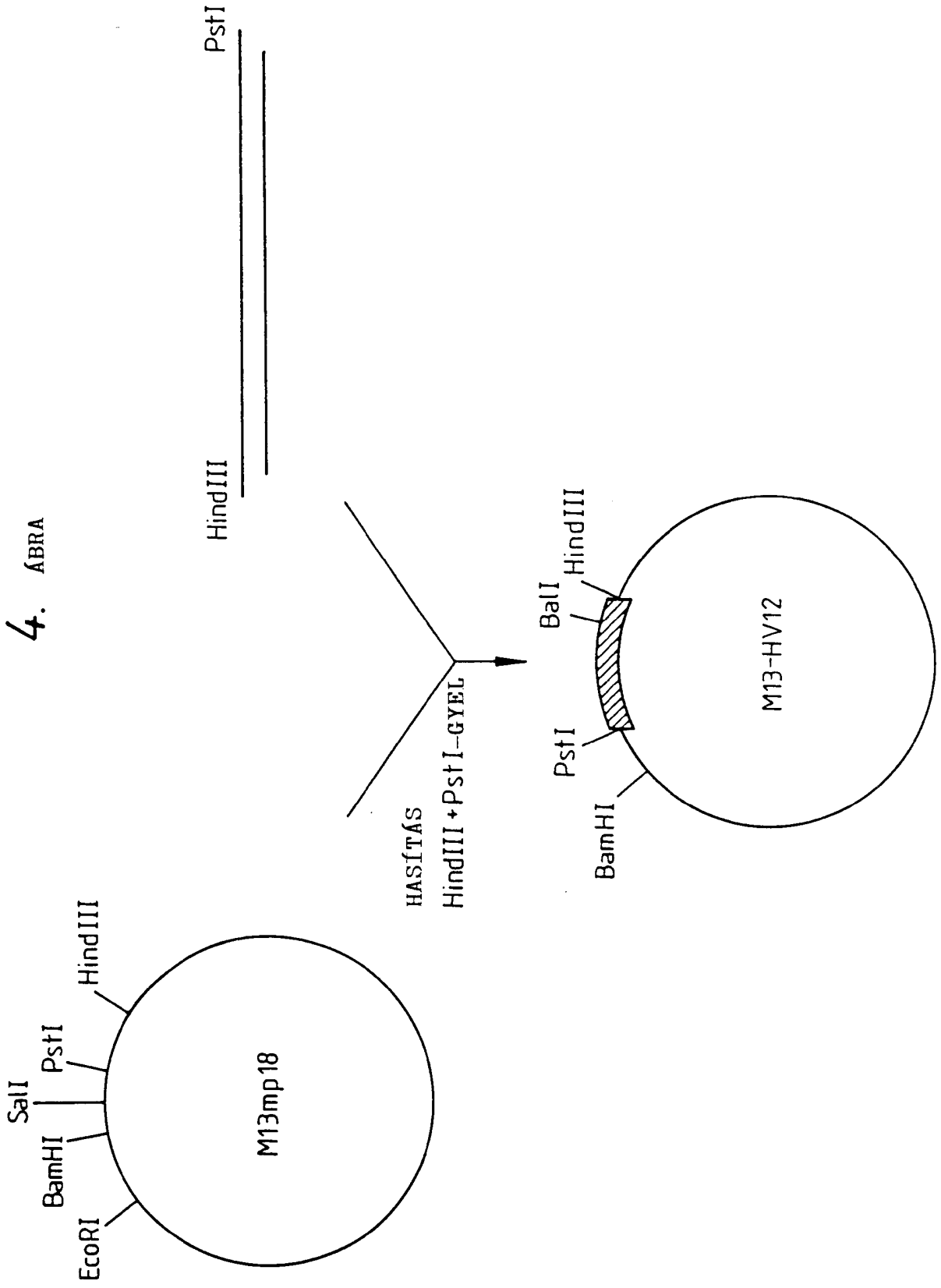
**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

88/92

15350/92

13/4

4. ÁBRA



88/92

5. ÁBRA

oligo 1 Omp A-Hirudin

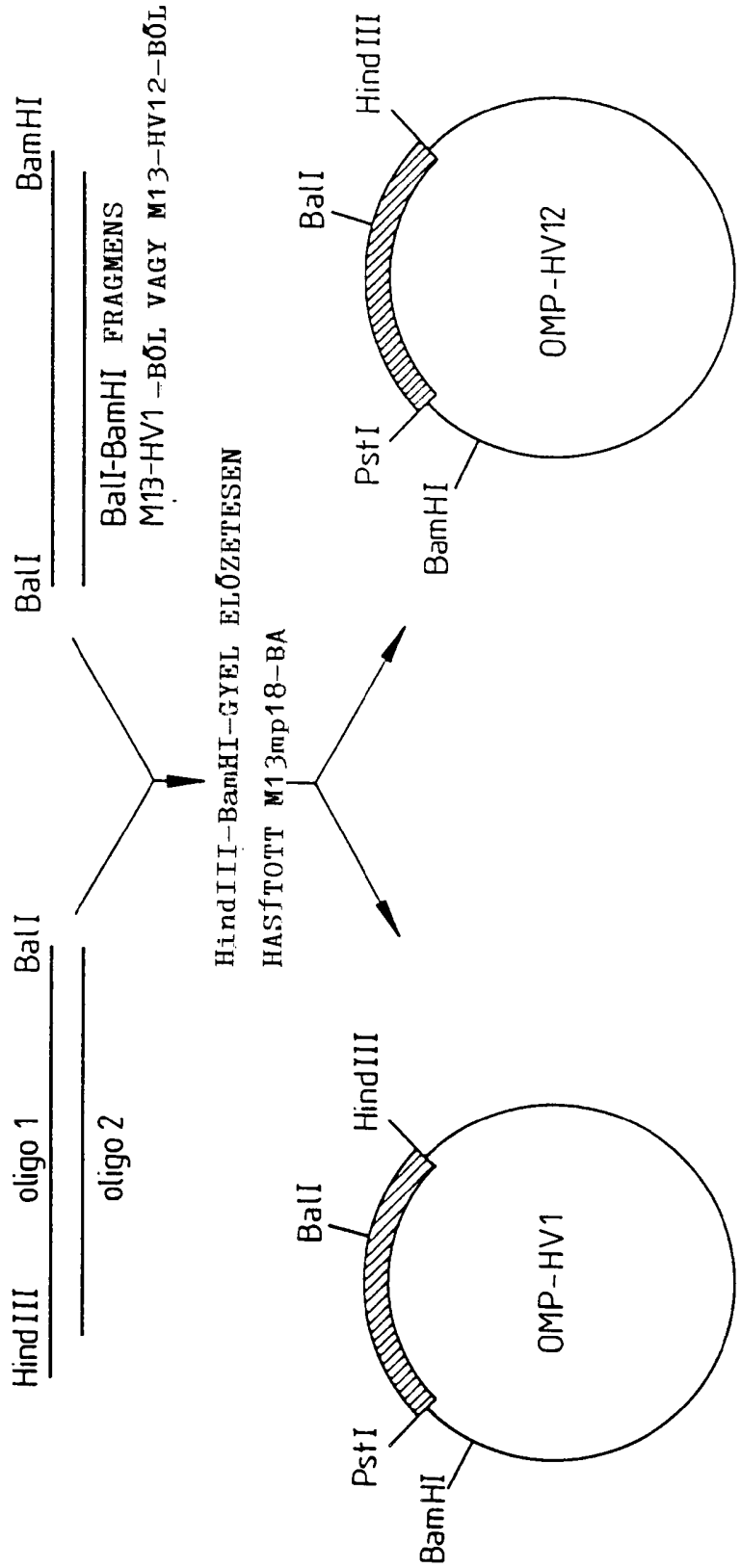
5' AGCTTTGATAACGAGGCGCAAAAATGAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCAGCTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCGTTGT

TTACTGACTGCACCGAATCTGG 3'

oligo 2 Omp A-Hirudin

5' CCAGATTGGTGAGTCAGTGTAACAACGGCTGGCTACGGTAGGGAACCAGCCAGTGCACCTGCAATCGGATAGCTGCTTTTTCATT

TTTTCTCGTTATCAA 3'

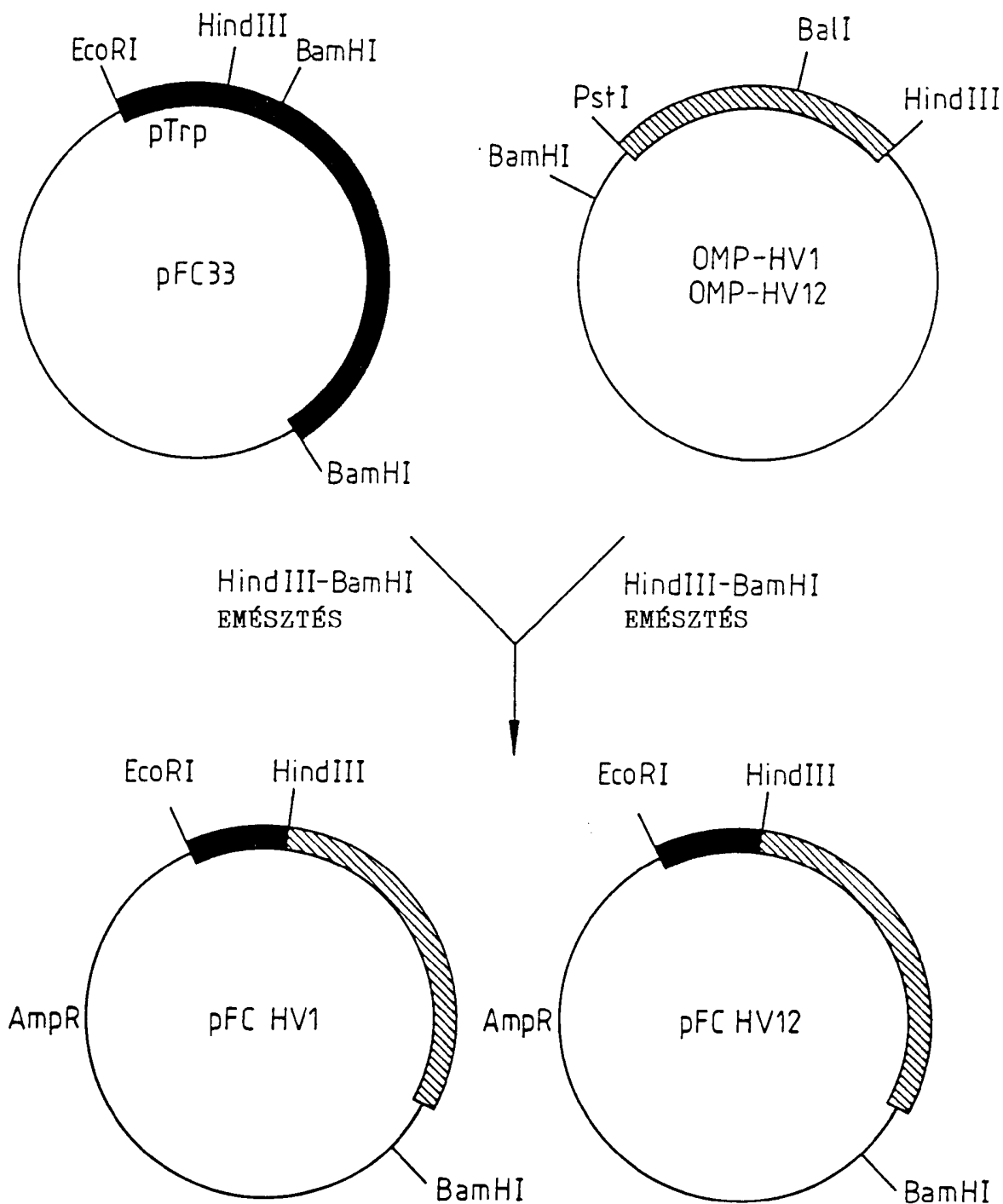


*[Handwritten signatures]*

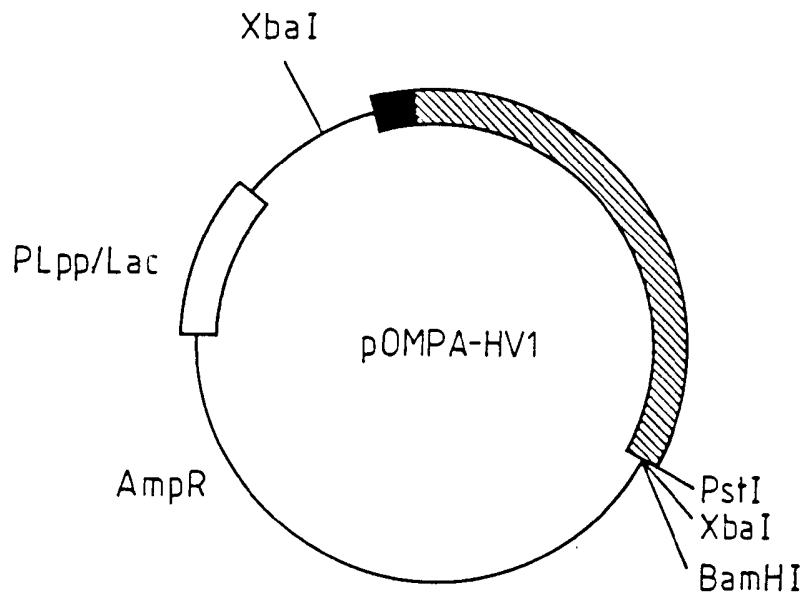
88/92

13/6

**6. ÁBRA**



7. ÁBRA



KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY

88/92

15250  
/92

13/8

8. ÁBRA

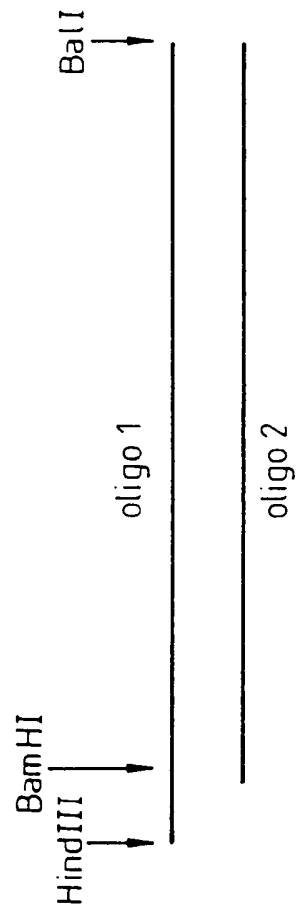
oligo 1 VSV

5' AGCTTGGATCCACTATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTATTTCATTGGGGTGAATTGGGTTTCTTACACCGACTGCACCGAATCTGG 3'

oligo 2 VSV

5' CCAGATTCGGTGCAGTCCGGTGTAGAAACCGCAATTGACCCCAATGAATAAAAAGGCTAAGTACAAAAGGCACCTTCATAGTGGATCCA 3'

KAPCSOLÁS:



*[Handwritten signatures]*

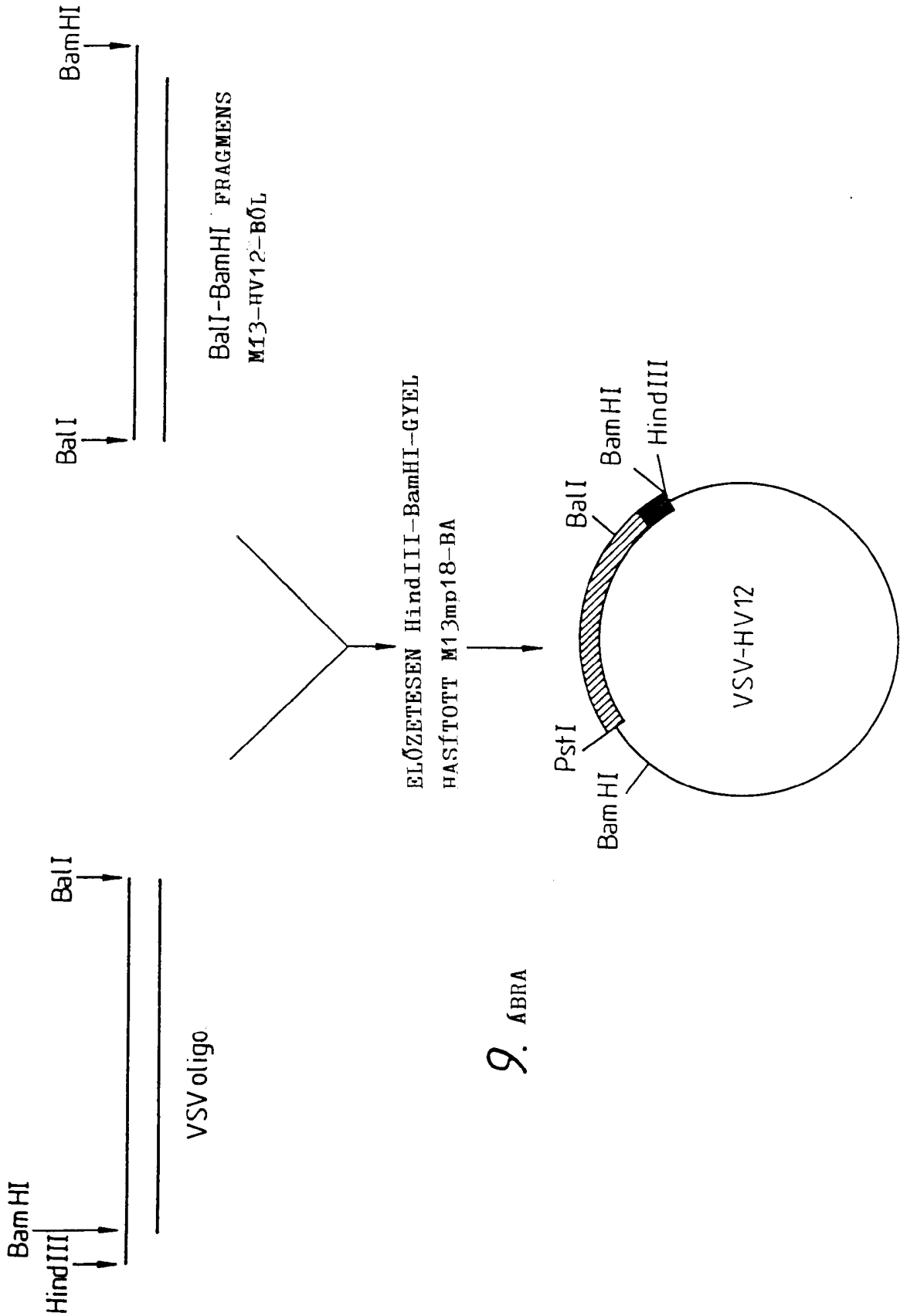
**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

15350

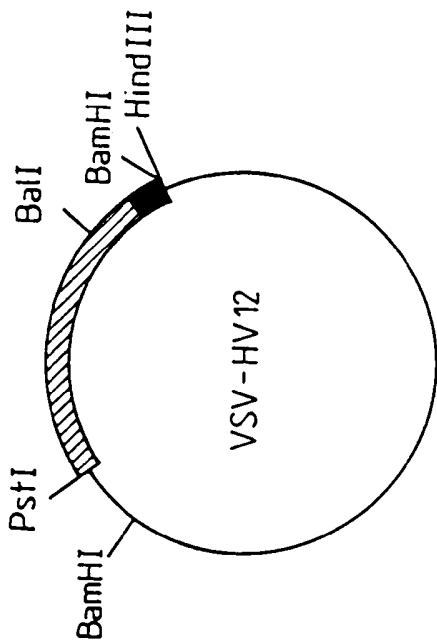
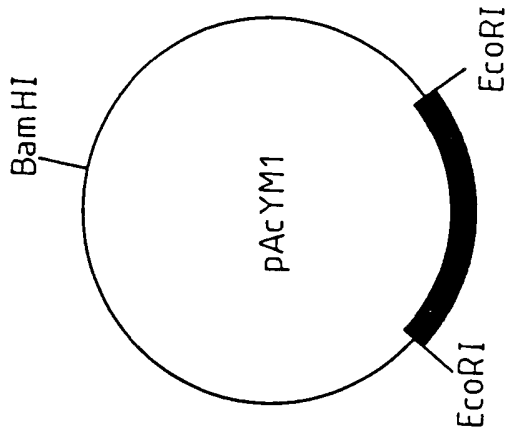
1/92

13/9

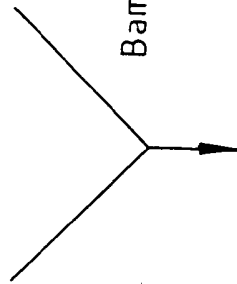
28/92



9. ABRA

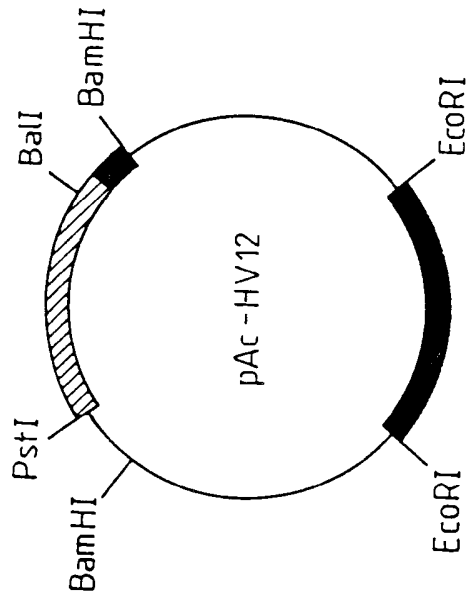


BamHI EMÉSZTÉS



BamHI EMÉSZTÉS

10. ÁBRA





11. ÁBRA

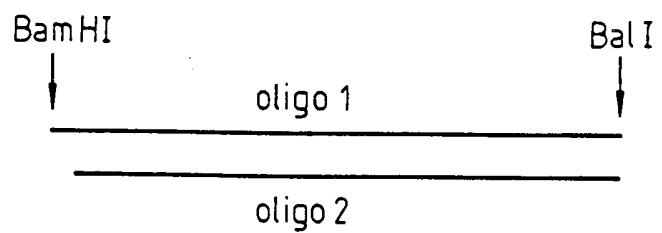
oligo 1 FUZIÓ

5' GATCCATGGTTTCTTACACCGACTGCACCGAATCTGG 3'

oligo 2 FUZIÓ

5' CCAGATTCGGTGCAGTCGGTGTAAGAACCATG 3'

KAPCSOLÁS:



88/92

15280/92

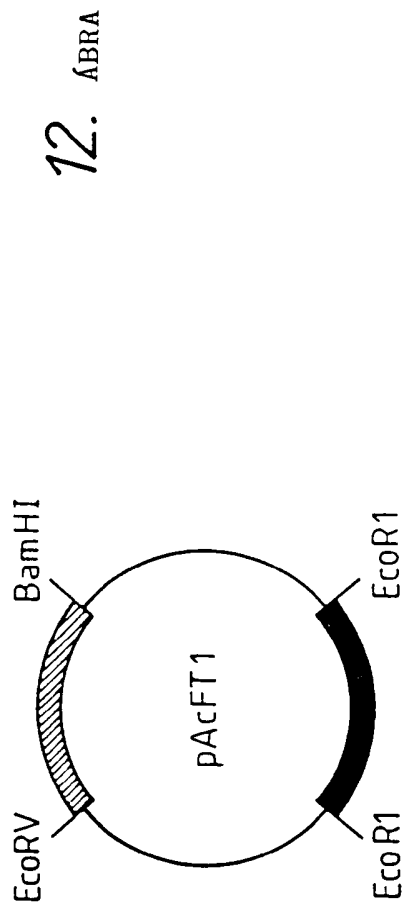
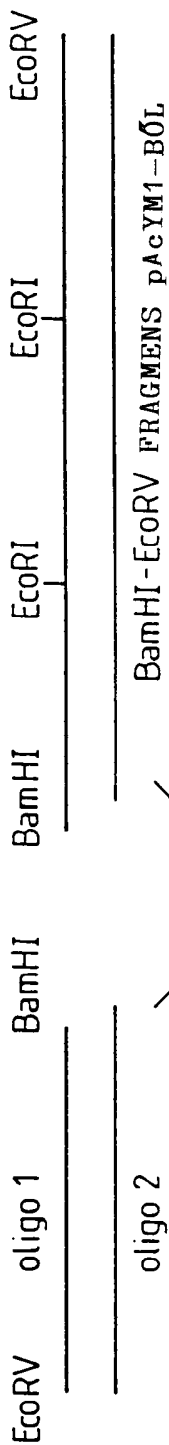
13/12

oligo 1 POLIHEDRIN

5' ATCATGGAGATAAATAAATGATAACCATCTCGCAATAAATAAGTATTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAAT  
ATGCCGGATTATTACATACCGTCCCACCACCATCGGGCGTACCTACGTGTACGACAACACCG 3'

oligo 2 POLIHEDRIN

5' GATCCGGTGTGTCGTACACGTAGGTACGCCCGATGGTGGGACGGTATGAATAATCCGGCATAATTTATAGGTTTTTTATTACAAAACTGTT  
ACGAAAACAGTAAATACTTATTTATTTGGAGATGGTTATCATTTAATTATCTCCATGAT 3'



88/92

88/92

13. ÁBRA

