

005/91

53.648/SZE

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**  
K I V O N A T



US705-014 111

Dezoxi-ribonukleinsav vektorok és vegyületek a humán  
C protein zimogén alakjainak kifejezésére

ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, Indiana,  
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1991. 02. 22.

Elsőbbsége: 1990. 02. 23. (07/484,133),  
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A találmány tárgya eljárás a humán C protein  
zimogén alakjainak előállítására rekombináns emlős sejtekkel.

Ugy járnak el, hogy egy eukarióta sejt vonalat  
egy olyan dezoxi-ribonukleinsav plazmid vektorral transz-  
formálnak, amely a terméket meghatározó nukleotid szekven-  
ciát tartalmazza, a molekula sejtmembránon való áthaladását  
elősegítő szignálszekvenciával és más szabályozó szakaszok-  
kal együtt.

A találmány szerinti eljárással előállított  
proteinek a véralvadási kaszkádban játszanak döntő sze-  
repet.

605/44

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

••••• "A"

01882 MZO<sub>5</sub>

53.648/SZE

Összevont és szabványosított  
1061 Budapest,  
Dalszínház u. 10.  
Telefon 153-3733, 131-4200

1991. 02. 22.  
1990. 02. 23.  
07/484,133

Dezoxi-ribonukleinsav vektorok és vegyületek a humán  
C protein zimogén alakjainak kifejezésére

**ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, Indiana,**

**AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK**

Feltalálók:

GERLITZ Bruce Edward,

GRINNELL Brian William,

INDIANAPOLIS, Indiana, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Bejelentés napja: 1991. 02. 22.

Elsőbbsége: 1990. 02. 23. (07/484,133),

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK



A találmány tárgya olyan új dezoxi-ribonukleinsavak és rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó vektorok, amelyek a humán C protein új zimogén alakjait határozzák meg. Ezeket a zimogéneket in vivo egyedül trombinnal aktiválhatjuk klinikailag jelentős mértékben, és sokkal inkább érzékenyebbek a trombin/trombomodulin aktivációra mint a natív C zimogén protein. A találmány szerinti expressziós vektorokkal egyszerűen és hatékonyan fejezhetjük ki a humán C protein zimogénjeit rekombináns gazdasejtekben. A natív humán C protein zimogénjei nagy koncentrációju trombinnal, illetve trombinnal és trombomodulinnal való kezelést igényelnek, esetleg más, drágán beszerezhető enzimes emésztést aktivációjukhoz. A találmány szerinti eljárást alkalmazva olyan humán C protein zimogén alakokat állíthatunk elő, amelyek a trombin számára sokkal jobb szubsztrátokat szolgáltatnak, és ezért kisebb koncentrációju trombinnal, trombinnal és trombomodulinnal, vagy más enzimekkel aktiválhatók. A legfontosabb tény az, hogy a találmány szerinti humán C protein zimogén alakjai fiziológiás koncentrációju kalciumionok jelenlétében is aktiválhatók, amely ionok a természetes C protein zimogénének trombinnal való aktivációját gátolják. A humán C protein új zimogén alakjai különböznek a szakirodalomból ismertektől az aktivációs peptid szekvencia aminosavaiban, ezek hasadnak le a zimogén alakokról az aktivált humán C protein keletkezésekor. A C protein új zimogén alakjai



különös előnyöket reprezentálnak a keringési megbetegedések kezelésekor, ideértve a véralvadást is.

A K vitamin dependens C protein egy olyan plazma fehérje, amelynek jelentős élettani szerepe van a hemosztázis szabályozásában. A C protein inaktív molekulaként bioszintetizálódik, ezt a leírásban naszcensz C proteinek nevezzük. A naszcensz C protein komplex átalakuláson megy át, eközben az alábbiakban részletesebben ismertetett, különböző inaktív molekulák keletkeznek. A leírásban az inaktív, szekretált C protein alakokat zimogén C proteineknek nevezzük. A C protein aktivációja a vérben egy trombomodulin-trombin komplex részvételével következik be. Az aktivált C protein, kofaktorával, az S. proteinnel együtt élettani szempontból rendkívül fontos antikoaguláns. Az aktivált C protein gátolhatja az intravaszkuláris trombózist, és szabályozza a már létező vérrögök nagyobbodását. A C protein aktivált alakjának hatásmechanizmusa és az inaktív zimogén aktív proteázává való alakulása nem régóta ismert folyamat /lásd Gardiner és Griffin, Progress in Hematology, XIII. kötet, 265 - 278., Brown, Grune és Stratton, Inc. kiadásában (1983); továbbá Esmon, Prog. Hemost. Thromb., 9, 29 - 55. (1989)/.

A C protein aktivációjakor trombinra van szükség, ez a véralvadási kaszkád végső szerin proteáza, az aktivációhoz továbbá szükség van egy endotel, sejtmembránhoz kötött glikoproteinre, amit trombomodulinnak nevezünk.



A trombomodulin erős, sztöchiometrikus komplexet képez a trombinnal. A trombomodulin, amikor kötődik a trombinhoz, drámaian megváltoztatja a trombin funkcionális tulajdonságait. A trombin közönséges körülmények között kiválasztja a fibrinogént, a vérlemezkéket összecsapja, és a véralvadásban szerepet játszó V és VIII kofaktorokat aktiv alakjaikká, az Va és VIIIA faktorokká alakítja. Végül, a trombin aktiválja a C proteint, azonban csak igen lassan és kevésbé hatékonyan, ez az aktivációs folyamat ezenkívül az élettani kalciumion koncentráció által gátolt. Ezzel szemben, a trombomodulinnal kapcsolt trombin nem választja ki a fibrinogént, nem aktiválja a vérlemezkéket, és nem alakítja át az V és VIII véralvadási faktorokat a megfelelő Va és VIIIA párjaikká, ugyanakkor igen hatásosan aktiválja a C protein zimogénjét fiziológias koncentrációju kalciumionok jelenlétében is. A trombomodulin-trombin komplex C protein zimogénjének aktivációs konstansa több mint 1000-szer nagyobb, mint a trombin reakciókonstansa.

Annak megértésére, hogy az aktivált C protein hogyan szabályozza a véralvadást, az alábbiakban röviden ismertetjük a véralvadási enzimrendszert.

A véralvadási rendszert legegyszerűbben mint egy láncreakciót kell vizsgálnunk, amely reakció során aktiv szerin proteázok jönnek létre a zimogének szekvenciális



aktivációja során. Ennek a láncreakciónak az eredményeképpen keletkezik a trombin enzim, amely limitált proteolizissal átalakítja a plazma fibrinogénjét az oldhatatlan fibrin géllé. A véralvadási kaszkád két kulcseseménye a X véralvadási faktor átalakulása Xa faktorrá, a reakciót a IXa véralvadási faktor szabályozza; a második fontos lépés a Xa faktor által szabályozott protrombin trombin-átalakulás. Mindkét reakció a sejt felületén zajlik, közelebbről a vérlemezke felületén, és mindkét reakció kofaktorok jelenlétét igényli. A major kofaktorok, név szerint az V és VIII faktorok viszonylag inaktív prekurzorokként keringenek a rendszerben, de amikor az első néhány trombin molekula megképződött, akkor a trombin jelenlétének hatására limitált proteolízis során aktiválódnak a kofaktorok. Az Va és VIIIA aktivált kofaktorok mind a protrombin trombinná alakulását, mind pedig a X faktor Xa faktorrá alakulását katalizálják, közelítően ötös reakciórendben. Az aktivált C protein hatására proteolitikusan degradálódik, hidrolizálódik és irreverzibilisen leépül az Va és VIIIA véralvadási faktor, azaz az V és VIII inaktív véralvadási faktorok aktív alakjai. Az V és VIII véralvadási faktorok ezzel szemben igen gyenge szubsztrátjai in vivo az aktivált C proteinnek.

Az aktivált C protein fontos kofaktora az S protein, egy másik K vitamin dependens plazma protein.



Az S protein jelentősen növeli a C protein aktivált alakja által szabályozott Va és VIIIA faktorok hidrolizisét, a növekedés mértéke 25-szörös.

A C protein értékes, terápiásan használható molekula /lásd például Bang és munkatársai, 4,775,624 számú amerikai szabadalmi leírás (1988. október 4.)/. Az aktivált C protein egy új antitrombotikus szer a hozzáférhető véralvadást gátlóknál, mint például a heparinnál vagy az orálisan adagolható hidroxikumarin típusú vegyületeknél szélesebb terápiás indexszel. Sem a C protein zimogénje, sem az aktivált C protein nem hatásos mindaddig, míg trombin nem keletkezik, mivel trombin szükséges ahhoz, hogy az V, Va és a VIII, VIIIA faktorokká alakuljon; ezen két kofaktor aktivált alakjai az aktivált C protein előnyös szubsztrátjai. Trombin szükséges a C protein zimogénjének aktiválásához is, ugyanis trombomodulin-trombin komplex nélkül a C protein zimogénje nem alakul át aktiv alakjává.

Az aktivált C protein közreműködést igénylő véralvadásgátló molekula, mivel az aktivált C protein úgy működik, hogy inaktiválja az Va és VIIIA kofaktorokat. Mivel trombin szükséges az V és VIII faktorok átalakítására a megfelelő Va és VIIIA párjaikká, a C protein antikoagulánsként csak akkor hat, ha trombin keletkezik. A konvencionális véralvadásgátlók, ellentétben az aktivált C proteinnel, konstans antikoagulációs állapotot tartanak fenn a vérkeringésben,



mégpedig annyi ideig, amíg a paciens kapja őket, ily módon jelentősen növelik a komplikációk bekövetkezésének lehetőségét, szemben a C proteinnel vagy annak aktivált alakjával. Az aktivált C protein ezért egy széleskörű klinikai felhasználásra alkalmas véralvadásgátló, amelyet a heparin és a hidroxikumarinok kiváltására használhatunk.

Egyes betegségekben, mint például az örökletes C protein-hiányban, a C protein zimogén nagy jelentőségű terápiás szer. A kongenitális homozigózis eredetű C protein-hiányban szenvedő betegek korai gyermekkorban elhaláloznak a disszeminált intravaszkuláris koaguláció gyakran letális alakjának, a purpura fulminans-nak a jelentkezésekor. A heterozigotikus C protein-hiányban szenvedő betegek több tromboembólikus tünetben szenvednek. Klinikailag megalapozott, hogy a B hemofiliában vagy IX véralvadási faktor-hiányban szenvedő betegek plazmaprotein koncentrátumokkal való kezelésekor a szer C protein-szennyezése miatt hatás mutatkozik az intravaszkuláris vérrög-képződésben a heterozigotikus C protein-hiány állapotában. A C protein koncentrációja ugyancsak abnormálisan alacsony trombotikus állapotban, mint például disszeminált intravaszkuláris koagulációkor, és olyan betegségi állapotokban, amelyek a trombózist megelőzik, mint például trauma vagy műtét után, és rákos állapotban.



A C protein aktivációjának és a találmány szerinti eljárásnak az ismertetésére és megértésére a naszcensz humán C protein kódoló szekvenciáját és a megfelelő aminosav szekvenciát az alábbiakban ismertetjük. Ezt az aminosav szekvenciát és ennek megfelelő részeit a leírásban nativ humán C proteinnek is nevezzük.



10 5'-ATG TGG CAG CTC ACA AGC CTC CTG CTG TTC GTG GCC ACC TGG GGA ATT  
H<sub>2</sub>N-MET TRP GLN LEU THR SER LEU LEU LEU PHE VAL ALA THR TRP GLY ILE  
5 10 15

15 50 60 70 80 90  
TCC GGC ACA CCA GCT CCT CTT GAC TCA GTG TTC TCC AGC AGC GAG CGT  
SER GLY THR PRO ALA PRO LEU ASP SER VAL PHE SER SER SER GLU ARG  
20 25 30

20 100 110 120 130 140  
GCC CAC CAG GTG CTG CGG ATC CGC AAA CGT GCC AAC TCC TTC CTG GAG  
ALA HIS GLN VAL LEU ARG ILE ARG LYS ARG ALA ASN SER PHE LEU GLU  
35 40 45

25 150 160 170 180 190  
GAG CTC CGT CAC AGC AGC CTG GAG CGG GAG TGC ATA GAG GAG ATC TGT  
GLU LEU ARG HIS SER SER LEU GLU ARG GLU CYS ILE GLU GLU ILE CYS  
50 55 60

30 200 210 220 230 240  
GAC TTC GAG GAG GCC AAG GAA ATT TTC CAA AAT GTG GAT GAC ACA CTG  
ASP PHE GLU GLU ALA LYS GLU ILE PHE GLN ASN VAL ASP ASP THR LEU  
65 70 75 80

35 250 260 270 280  
GCC TTC TGG TCC AAG CAC GTC GAC GGT GAC CAG TGC TTG GTC TTG CCC  
ALA PHE TRP SER LYS HIS VAL ASP GLY ASP GLN CYS LEU VAL LEU PRO  
85 90 95

40 290 300 310 320 330  
TTG GAG CAC CCG TGC GCC AGC CTG TGC TGC GGG CAC GGC ACG TGC ATC  
LEU GLU HIS PRO CYS ALA SER LEU CYS CYS GLY HIS GLY THR CYS ILE  
100 105 110



5  
 340 350 360 370 380  
 GAC GGC ATC GGC AGC TTC AGC TGC GAC TGC CGC AGC GGC TGG GAG GGC  
 ASP GLY ILE GLY SER PHE SER CYS ASP CYS ARG SER GLY TRP GLU GLY  
 115 120 125

10  
 390 400 410 420 430  
 CGC TTC TGC CAG CGC GAG GTG AGC TTC CTC AAT TGC TCG CTG GAC AAC  
 ARG PHE CYS GLN ARG GLU VAL SER PHE LEU ASN CYS SER LEU ASP ASN  
 130 135 140

15  
 440 450 460 470 480  
 GGC GGC TGC ACG CAT TAC TGC CTA GAG GAG GTG GGC TGG CGG CGC TGT  
 GLY GLY CYS THR HIS TYR CYS LEU GLU GLU VAL GLY TRP ARG ARG CYS  
 145 150 155 160

20  
 490 500 510 520  
 AGC TGT GCG CCT GGC TAC AAG CTG GGG GAC GAC CTC CTG CAG TGT CAC  
 SER CYS ALA PRO GLY TYR LYS LEU GLY ASP ASP LEU LEU GLN CYS HIS  
 165 170 175

25  
 530 540 550 560 570  
 CCC GCA GTG AAG TTC CCT TGT GGG AGG CCC TGG AAG CGG ATG GAG AAG  
 PRO ALA VAL LYS PHE PRO CYS GLY ARG PRO TRP LYS ARG MET GLU LYS  
 180 185 190

30  
 580 590 600 610 620  
 AAG CGC AGT CAC CTG AAA CGA GAC ACA GAA GAC CAA GAA GAC CAA GTA  
 LYS ARG SER HIS LEU LYS ARG ASP THR GLU ASP GLN GLU ASP GLN VAL  
 195 200 205

35  
 630 640 650 660 670  
 GAT CCG CGG CTC ATT GAT GGG AAG ATG ACC AGG CGG GGA GAC AGC CCC  
 ASP PRO ARG LEU ILE ASP GLY LYS MET THR ARG ARG GLY ASP SER PRO  
 210 215 220

40  
 680 690 700 710 720  
 TGG CAG GTG GTC CTG CTG GAC TCA AAG AAG AAG CTG GCC TGC GGG GCA  
 TRP GLN VAL VAL LEU LEU ASP SER LYS LYS LYS LEU ALA CYS GLY ALA  
 225 230 235 240

45  
 730 740 750 760  
 GTG CTC ATC CAC CCC TCC TGG GTG CTG ACA GCG GCC CAC TGC ATG GAT  
 VAL LEU ILE HIS PRO SER TRP VAL LEU THR ALA ALA HIS CYS MET ASP  
 245 250 255



5  
770 780 790 800 810  
GAG TCC AAG AAG CTC CTT GTC AGG CTT GGA GAG TAT GAC CTG CGG CGC  
GLU SER LYS LYS LEU LEU VAL ARG LEU GLY GLU TYR ASP LEU ARG ARG  
260 265 270

10  
820 830 840 850 860  
TGG GAG AAG TGG GAG CTG GAC CTG GAC ATC AAG GAG GTC TTC GTC CAC  
TRP GLU LYS TRP GLU LEU ASP LEU ASP ILE LYS GLU VAL PHE VAL HIS  
275 280 285

15  
870 880 890 900 910  
CCC AAC TAC AGC AAG AGC ACC ACC GAC AAT GAC ATC GCA CTG CTG CAC  
PRO ASN TYR SER LYS SER THR THR ASP ASN ASP ILE ALA LEU LEU HIS  
290 295 300

20  
920 930 940 950 960  
CTG GCC CAG CCC GCC ACC CTC TCG CAG ACC ATA GTG CCC ATC TGC CTC  
LEU ALA GLN PRO ALA THR LEU SER GLN THR ILE VAL PRO ILE CYS LEU  
305 310 315 320

25  
970 980 990 1000  
CCG GAC AGC GGC CTT GCA GAG CGC GAG CTC AAT CAG GCC GGC CAG GAG  
PRO ASP SER GLY LEU ALA GLU ARG GLU LEU ASN GLN ALA GLY GLN GLU  
325 330 335

30  
1010 1020 1030 1040 1050  
ACC CTC GTG ACG GGC TGG GGC TAC CAC AGC AGC CGA GAG AAG GAG GCC  
THR LEU VAL THR GLY TRP GLY TYR HIS SER SER ARG GLU LYS GLU ALA  
340 345 350

35  
1060 1070 1080 1090 1100  
AAG AGA AAC CGC ACC TTC GTC CTC AAC TTC ATC AAG ATT CCC GTG GTC  
LYS ARG ASN ARG THR PHE VAL LEU ASN PHE ILE LYS ILE PRO VAL VAL  
355 360 365

40  
1110 1120 1130 1140 1150  
CCG CAC AAT GAG TGC AGC GAG GTC ATG AGC AAC ATG GTG TCT GAG AAC  
PRO HIS ASN GLU CYS SER GLU VAL MET SER ASN MET VAL SER GLU ASN  
370 375 380

45  
1160 1170 1180 1190 1200  
ATG CTG TGT GCG GGC ATC CTC GGG GAC CGG CAG GAT GCC TGC GAG GGC  
MET LEU CYS ALA GLY ILE LEU GLY ASP ARG GLN ASP ALA CYS GLU GLY  
385 390 395 400





ahol	
A	dezoxi-adenil-,
G	dezoxi-guanil-,
C	dezoxi-citidil-,
T	timidilcsoport,
ALA	alanin,
ARG	arginin,
ASN	aszparagin,
ASP	aszparaginsav,
-COOH	karboxilcsoport,
CYS	cisztein,
GLN	glutamin,
GLU	glutaminsav,
GLY	glicin,
HIS	hisztidin,
H <sub>2</sub> N-	aminocsoport,
ILE	izoleucin,
LEU	leucin,
LYS	lizin,
MET	metionin,
PHE	fenil-alanin,
PRO	prolin,
SER	szerin,
THR	treonin,
TRP	triptofán,



TYR                    tirozin, és  
VAL                    valin.

A fentiekben ismertetett dezoxi-ribonukleinsav szekvencia a humán C proteint meghatározó humán máj m-ribonukleinsavból előállított komplementer dezoxi-ribonukleinsav klónokból származik. A témában jártas szakemberek tudják, hogy a genetikai kód degenerált volta lehetővé teszi hasonló aminosav szekvenciákat meghatározó különböző dezoxi-ribonukleinsavak előállítását. A naszcensz humán C protein fentiekben megadott komplementer dezoxi-ribonukleinsav (cDNS) szekvenciája így csak egyike a lehetséges sok naszcensz humán protein C-t kódoló szekvenciának. A komplementer dezoxi-ribonukleinsav klónok előállítására egy 5'-poli-guanin szekvencia, egy 3'-poli-citozin szekvencia és mind az 5'-, mind a 3'-végen PstI restrikciós enzim által felismerhető hely lett kiépítve a C proteint meghatározó komplementer dezoxi-ribonukleinsav végein. Két cDNS klónt úgy manipuláltunk, hogy az tartalmazzon egy olyan dezoxi-ribonukleinsav molekulát, amely magábfoglalja a humán C protein naszcensz alakjának kódoló szekvenciáját és a dezoxi-ribonukleinsavnak azt a részét, amely a kódoló régió 5'- és 3'-végein a nem transzlatált mRNS-t határozza meg. Ezt a dezoxi-ribonukleinsav molekulát a pBR322 jelű plazmid PstI helyére építettük be, amiután megkaptuk a pHC7 jellel



jelzett plazmidot. A pH7 plazmid így tartalmazza a fenti kódoló szekvenciát, és - ismét csak a molekula egyik szálát ismertetve - tartalmazza az alábbi szekvenciát is:

```
5'-C TGC AGG GGG GGG GGG GGG GGG GGG CTG TCA TGG CGG CAG GAC
      GGC GAA CTT GCA GTA TCT CCA CGA CCC GCC CCT ACA GGT GCC
      AGT GCC TCC AGA-3'
```

és

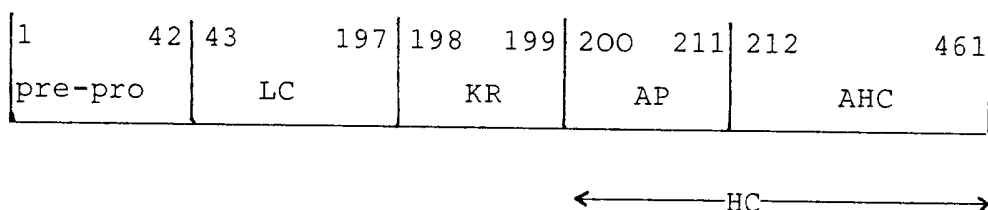
```
5'-CGA CCC TCC CTG CAG GGC TGG GCT TTT GCA TGG CAA TGG ATG GGA
      CAT TAA AGG GAC ATG TAA CAA GCA CAC CCC CCC CCC CCC CCC
      CCC CCC CCT GCA G-3'
```

a naszcensz humán C proteint meghatározó kódoló szekvencia sorrendben 5'- és 3'-végein. A dezoxi-ribonukleinsav komplementer bázis-párosodásának megfelelően a kétszálú dezoxi-ribonukleinsav egyik szálának szekvenciáját ismerve meghatározhatjuk a második szál szekvenciáját is. A pH7 plazmid ismert módon izolálható az *E. coli* K12 RR1/pH7 törzsből, amelyet a Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Peoria, Illinois, törzsgyűjteményében találunk meg. Az *E. coli* K12 RR1/pH7 törzs tenyészetét az NRRL törzsgyűjteményéből NRRL B-15926 sorszámon megrendelhetjük. A pH7 plazmid restrikciós térképét és funkcionális helyeit a leíráshoz mellékletként csatolt 2. ábrán adjuk meg.





A naszcenzs C proteint sematikusan az alábbiak szerint is leírhatjuk:



pre-pro : A naszcenzs humán C protein 1 - 42. aminosavai egy szignálpeptidet határoznak meg, és leírják a humán C protein propeptid részét, ezek fontosak a szekréció irányításában és a C protein gamma-karboxilezésében.

LC : A naszcenzs C protein 43 - 197. aminosavai transzlációt követő módosulás után képviselik mind a kétláncu zimogén, mind pedig a C protein aktivált alakjainak könnyű láncát (LC). A kétláncu zimogén az egyláncu zimogén alakból keletkezik úgy, hogy az ábrán szereplő KR dipeptid lehasad (lásd alább is).

KR : A naszcenzs humán C protein 198 - 199. aminosavai, amelyek valószínűleg kétlépéses reakcióban lehasadnak (a szarvasmarha C protein analógiája szerint). A kétlépéses reakció első lépéseként vagy a 197 - 198., vagy a



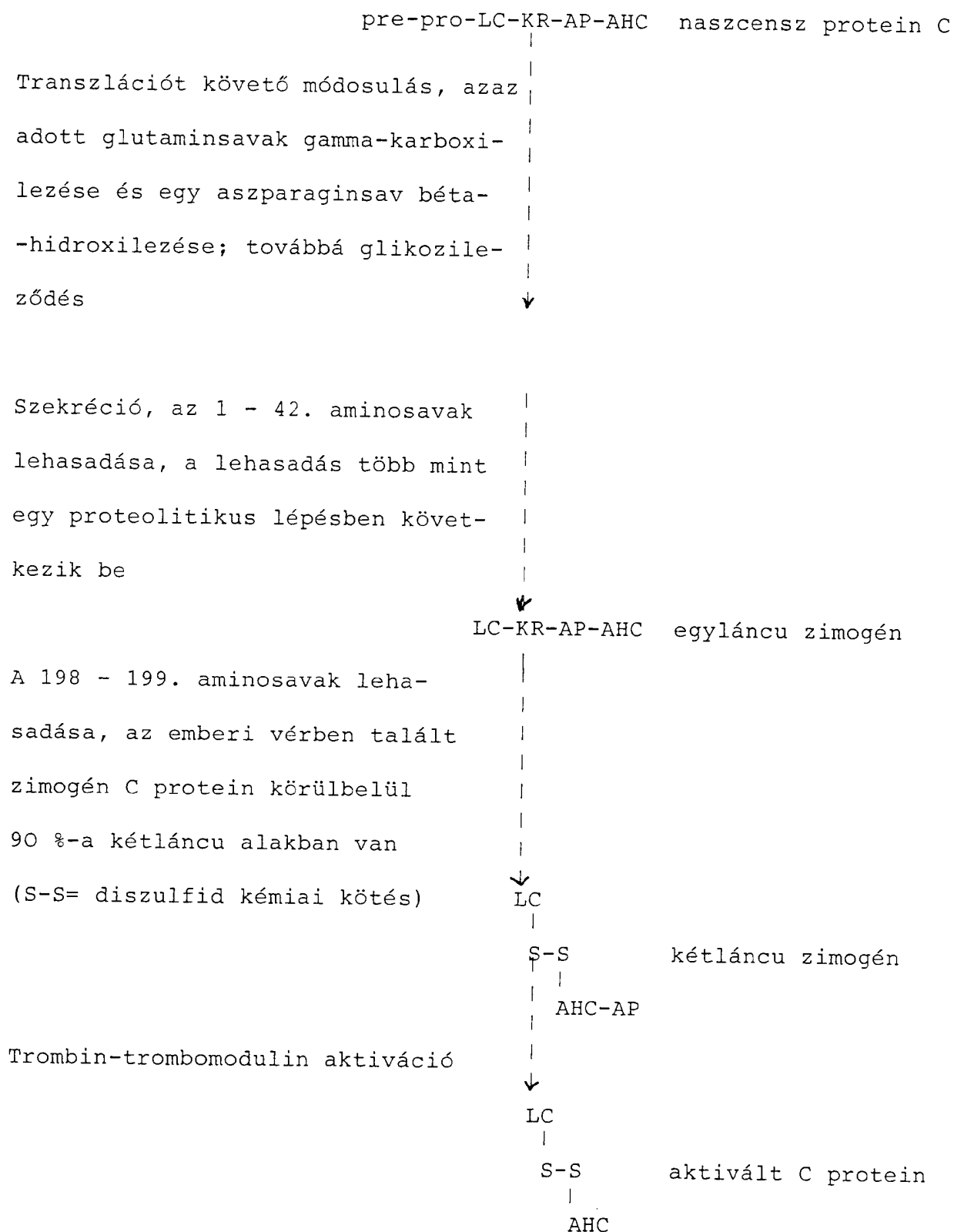
199 - 200. aminosavak között hasad a szekvencia, majd karboxi-peptidáz vagy amino-peptidáz enzimek hatására tovább hasad, amiután létrejön a kétláncu C protein.

- AP : A naszcensz C protein 200 - 211. aminosavai az aktivációs peptidet reprezentálják, amely a C protein zimogén alakjairól lehasadva létrehozza az aktivált C proteint.
- AHC : A naszcensz C protein 212 - 461. aminosavai transzlációt követő módosulás után alkotják az aktiv C protein aktivált nehéz láncát (AHC).
- HC : A C zimogén protein kétláncból álló alakjának nehéz lánc, amely transzlációt követő módosulás után a 200 - 461. aminosavból áll, és az AP és AHC szekvenciát alkotja.



A humán C protein zimogén egy olyan szerin proteáz prekursor, amely a májban szintetizálódik, és a vérben van jelen. A teljes biológiai aktivitás expresszálásához a C protein poszt-transzlációs (transzlációt követő) változtatására van szükség, ez a folyamat K vitamin-igényű. A kétláncu, diszulfid-hidakkal összekapcsolt C protein zimogénje az egyláncu zimogénből keletkezik limitált proteolizist követően. A limitált proteolizis valószínűleg hasításokat hoz létre, és eltávolítja a 198. és 199. aminosavakat. A kétláncu zimogén aktivációja aktiv szerin proteázzá együttjár az ARG-LEU peptidkötés proteolitikus hasításával (a 211. és a 212. aminosav). Ez utóbbi hasadást követően egy dodekapeptid (200 - 211. aminosav) keletkezik, ez az aktivációs peptid, amely a kétláncu zimogén molekula nehéz láncának aminoterminális végét tartalmazza. A C protein nagymértékben glikozilezett, a plazmában levő érett enzim 15 - 23 % szénhidrátot tartalmaz. A C protein több szokatlan aminosavat is tartalmaz, így gamma-karboxi-glutaminsavat és béta-hidroxi-aszparaginsavat (eritro-L-béta-hidroxi-aszparaginsav). A gamma-karboxi-glutaminsav (gla) gamma-glutamil karboxilezéssel keletkezik a glutaminsavból, a reakciót a kofaktorként K vitamint igénylő májban levő mikroszómális karboxiláz katalizálja.

A humán C protein aktiválását sematikusán az alábbiak szerint is megadhatjuk. A témában jártas szakemberek tudják, hogy a sematikus ábrázolásban megadott reakciólépések sorrendje szükségszerűen nem azonos az in vivo reakciósorrenddel.



A találmány tárgya eljárás C protein ujszerű zimogénjeinek rekombináns expresszáására, a találmány tárgyához tartoznak az új vegyületek, dezoxi-ribonukleinsav vektorok, transzformánsok és az expresszió módszerei is.

A leírásban használt kifejezéseket az alábbiakban magyarázzuk.

Ad2LP - a 2 típusú adenovírus nagy késői promotere.

A leírásban szereplő proteinek vagy peptidek ismertetésekor az alábbi rövidítéseket használjuk az aminosavak leírásakor:

Hárombetűs rövidítés	A m i n o s a v a k	Egybetűs rövidítés
PHE	fenilalanin	F
LEU	leucin	L
ILE	izoleucin	I
MET	metionin	M
VAL	valin	V
SER	szerin	S
PRO	prolin	P
THR	treonin	T
ALA	alanin	A
TYR	tirozin	Y



Hárombetűs rövidítés	Aminosavak	Egybetűs rövidítés
HIS	hisztidin	H
GLN	glutamin	Q
ASN	aszparagin	N
LYS	lizin	K
ASP	aszparaginsav	D
GLU	glutaminsav	E
CYS	cisztein	C
TRP	triptofán	W
ARG	arginin	R
GLY	glicin	G

-----

ApR - ampicillin rezisztens fenotípus vagy az ezt a tulajdonságot meghatározó gén.

BK - BK vírusból származó dezoxi-ribonukleinsav.

Enh vagy enhancer -

A BK vírus enhancere.

ep vagy SV40ep -

A T antigén gén SV40 korai promotereiből, a T antigén kötőhelyeiből, az SV40 enhancerből és az SV40 replikációs origóból álló dezoxi-ribonukleinsav szegmens.



gamma-karboxilezés - egy olyan reakció, amely a glutaminsav gamma-szénatomjához egy karboxilcsoportot kapcsol.

gamma-karboxilezett protein -  
egy olyan protein, amelyben egyes glutaminsavak gamma-karboxilezve vannak.

GBMT transzkripciós egység -  
egy módosított, az alábbi részekből álló transzkripciós szabályozó egység: a BK vírusból származó P2 enhancer, amely szorosan az adenovirus nagyobb késői promoterének 5'-irányban elhelyezkedő szabályozó elemének közelében helyezkedik el; az adenovirus-2 nagyobb késői promotere, egy poli-GT elem, amely a fenti promoter működését elősegítő módon helyezkedik el, végül egy olyan dezoxi-ribonukleinsav szekvencia, amely az adenovirus módosított szignálszekvenciáját tartalmazza. A GBMT transzkripciós egység a pGT-h plazmid körülbelül 900 bázispárból álló HindIII restriktív fragmensén helyezkedik el.





- IVS - Intront kódoló dezoxi-ribonukleinsav, amit interveniáló szekvenciának is nevezünk.
- MMTpro - Az egér metallothionein-I génjének promotere.
- naszcenz protein -  
Az a polipeptid, amely egy mRNS transzkriptum transzlációjakor keletkezik, mindenféle transzlációt követő módosulás előtt. Ezt értjük ezalatt, annak ellenére, hogy a transzlációt követő módosulások, mint például a glutaminsav gamma-karboxileződése és az aszparaginsav hidroxileződése elkezdődhet már akkor, amikor a protein mRNS transzkriptumról való transzlációja teljes egészében még nem fejeződött be.
- NeoR - Neomicin rezisztenciát meghatározó gén, ez a gén rezisztenciát biztosíthat a G418 antibiotikummal szemben is.
- pA - Poliadenilezési szignált kódoló dezoxi-ribonukleinsav szekvencia.
- Promoter - Az a dezoxi-ribonukleinsav szekvencia, amely a dezoxi-ribonukleinsav átírását biztosítja ribonukleinsavvá.
- C protein aktivitás -  
Proteolitikus, amidolitikus, eszterolitikus és biológiai (véralvadásgátló vagy profibrinolitikus) aktivitásokért felelős humán C protein bármely tulajdonsága. A protein alvadásgátló



aktivitásának meghatározására használható módszerek jól ismertek a szakirodalomban, lásd például Grinnell és munkatársai /Biotechnology, 5, 1189. (1987)/.

Rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó vektor -

Bármilyen molekula, ideértve - nem limitáló jelleggel - a kromoszómába beépülőket, az autonom replikálódó plazmidokat és a fágokat, azaz azokat a dezoxi-ribonukleinsav molekulákat, amelyekhez egy vagy több további dezoxi-ribonukleinsav szegmens kapcsolható, vagy szegmenst kapcsolunk.

Rekombináns dezoxi-ribonukleinsav expressziós vektor -

Bármely rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó vektor, amelybe egy promotert építettünk be olyan helyre, hogy egy géntermék expresszióját irányítsa.

Rekombináns dezoxi-ribonukleinsav vektor -

Bármely rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó vagy expressziós vektor.

Replikon - Az a dezoxi-ribonukleinsav szekvencia, amely szabályozza és lehetővé teszi egy plazmid vagy valamely más vektor autonóm replikációját.

Restrikciós fragmens -

Bármely olyan lineáris dezoxi-ribonukleinsav



szekvencia, amely egy vagy több restrikciós endonukleáz enzim hatására keletkezett.

Érzékeny gazdasejt -

Olyan kiindulási sejt, amely egy adott antibiotikum vagy más, toxikus vegyület jelenlétében nem képes növekedni anélkül, hogy az adott anyagokkal szembeni rezisztenciát biztosító dezoxi-ribonukleinsav szegmenst építenék be.

TcR - Tetraciklin rezisztens fenotípus vagy az ezt meghatározó gén.

Transzformáció - Recipiens gazdasejtbe dezoxi-ribonukleinsav bejuttatása, amely után a recipiens sejt genotípusa megváltozik.

Transzformáns - Transzformált recipiens gazdasejt.

Transzlációs aktivációs szekvencia -

Bármely olyan dezoxi-ribonukleinsav szekvencia, amely riboszómális kötőhelyet kódol, és transzlációs start kodont tartalmaz, mint például 5'-ATG-3'; ezek jelenléte biztosítja egy mRNS transzkriptum transzlációját peptiddé vagy polipeptiddé.

Zimogén - Egy proteolitikus enzim enzimatikusan inaktív prekurzora. A leírásban használt C protein zimogén kifejezés egy szekretált inaktív C protein egyik vagy mindkét láncát jelenti.

Az alábbiakban ismertetjük a leíráshoz adott ábrákat.

Az 1. ábrán megadjuk a pLPC-N plazmid restrikciós és funkcionális térképét. A leíráshoz, mivel erre nincs szükség, nem méretarányos ábrákat adunk meg.

A 2. ábrán ismertetjük a pLPC-FN plazmid restrikciós helyeit és funkcionális térképét.

A 3. ábrán megadjuk a pLPC-SC plazmid restrikciós és funkcionális térképét.

A 4. ábrán lerajzoltuk a pLPC-LIN plazmid restrikciós és funkcionális térképét.

Az 5. ábrán látható a pLPC-FLIN plazmid restrikciós és funkcionális térképe.

A 6. ábrán ismertetjük a pGTC plazmid restrikciós és funkcionális térképét.

A 7. ábrán megadjuk a pGT-d plazmid restrikciós és funkcionális térképét.

A 8. ábrán megadjuk a pGT-h plazmid restrikciós és funkcionális térképét.



A találmány szerinti eljárással olyan dezoxi-ribonukleinsavakat állítunk elő, amelyek a humán C protein új zimogén alakjainak expresszióját határozzák meg. A természetes humán C protein zimogén és a naszcensz humán C protein előállítására vonatkozóan több módszert találunk a szakirodalomban (lásd Bang és munkatársai, 4,775,624 számú amerikai szabadalmi leírás, 1988. október 4: a leírásban megadottakat referenciaként a leírásba beépítjük). A szakirodalomban szereplő módszerek a humán C protein olyan zimogén alakjainak az expresszióját teszik lehetővé, amelyek aminosav szekvenciájukban nem különböznek a humán vérben jelenlevő zimogén alakoktól. Az ezekkel a módszerekkel előállított C protein zimogéneket bizonyos anyagokkal, például alfa-trombinnal, tripszinnel vagy trombin és trombomodulin keverékével kell kezelnünk (in vivo vagy in vitro) ahhoz, hogy aktivált C proteinhez jussunk. Ezenkívül, a természetes körülmények között az emberi vérben található humán C protein zimogén alakjaival azonos aminosav szekvenciájú, rekombináns dezoxi-ribonukleinsav technológiával előállított humán C protein zimogén alak a testben természetes aktivációs úton csak a trombin-trombomodulin komplex működésével aktivizálódik. A természetes humán C protein zimogénje egyedül trombinnal aktiválható, az aktiváció azonban kalciumionok hiányához kötött, és ilyen nagy koncentrációjú trombin és/vagy C protein zimogén nem rendelkezik szignifikáns in vivo metabolikus



uttal ahhoz, hogy C proteinné aktivizálódjon.

A találmány szerinti eljárással olyan humán C protein zimogén alakokat állíthatunk elő, amelyek in vivo aktiválhatók egyedül trombinnal, négyedig klinikailag elfogadható mértékben. Ezenkívül, ezek a zimogén alakok érzékenyebbek a trombin/trombomodulin aktivációra, mint a természetes humán C protein zimogén. A találmány szerint előállítunk olyan dezoxi-ribonukleinsavakat, rekombináns dezoxi-ribonukleinsav expressziós vektorokat, transzformált sejtvonalakat, amelyekkel a találmány szerinti módszereket használva a humán C protein fenti új zimogén alakjainak expresszióját érjük el. A humán C protein ezen zimogén alakjainak előállítására a találmány értelmében

- A/ egy eukarióta gazdasejtet olyan rekombináns dezoxi-ribonukleinsav vektorral transzformálunk, amely vektor áll:
- a) az aminoterminális végtől a karboxilterminális végig az alábbi részekből álló aminosav szekvenciát kódoló dezoxi-ribonukleinsav szekvenciából:
    - I: egy szignálpeptid és egy gamma-karboxilezett propeptid, szekretált protein;
    - II: a humán C protein könnyű lánc;
    - III: az LYS-ARG, ARG-LYS, LYS-LYS és ARG-ARG



dipeptidek bármelyike; végül

IV: az alábbi aminosav szekvencia:

ASP THR GLU R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> R<sub>4</sub> R<sub>5</sub> R<sub>6</sub>  
R<sub>7</sub> R<sub>8</sub> R<sub>9</sub> R<sub>10</sub> R<sub>11</sub> R<sub>12</sub> GLY LYS MET THR ARG ARG GLY ASP SER PRO  
TRP GLN VAL VAL LEU LEU ASP SER LYS LYS LYS LEU ALA CYS GLY ALA  
VAL LEU ILE HIS PRO SER TRP VAL LEU THR ALA ALA HIS CYS MET ASP  
GLU SER LYS LYS LEU LEU VAL ARG LEU GLY GLU TYR ASP LEU ARG ARG  
TRP GLU LYS TRP GLU LEU ASP LEU ASP ILE LYS GLU VAL PHE VAL HIS  
PRO ASN TYR SER LYS SER THR THR ASP ASN ASP ILE ALA LEU LEU HIS  
LEU ALA GLN PRO ALA THR LEU SER GLN THR ILE VAL PRO ILE CYS LEU  
PRO ASP SER GLY LEU ALA GLU ARG GLU LEU ASN GLN ALA GLY GLN GLU  
THR LEU VAL THR GLY TRP GLY TYR HIS SER SER ARG GLU LYS GLU ALA  
LYS ARG ASN ARG THR PHE VAL LEU ASN PHE ILE LYS ILE PRO VAL VAL  
PRO HIS ASN GLU CYS SER GLU VAL MET SER ASN MET VAL SER GLU ASN  
MET LEU CYS ALA GLY ILE LEU GLY ASP ARG GLN ASP ALA CYS GLU GLY  
ASP SER GLY GLY PRO MET VAL ALA SER PHE HIS GLY THR TRP PHE LEU  
VAL GLY LEU VAL SER TRP GLY GLU GLY CYS GLY LEU LEU HIS ASN TYR  
GLY VAL TYR THR LYS VAL SER ARG TYR LEU ASP TRP ILE HIS GLY HIS  
ILE ARG ASP LYS GLU ALA PRO GLN LYS SER TRP ALA PRO-COOH,

	ahol
R <sub>1</sub>	ASP vagy LEU,
R <sub>2</sub>	GLN vagy HIS,
R <sub>3</sub>	GLU vagy LYS,
R <sub>4</sub>	ASP vagy LEU,
R <sub>5</sub>	GLN,
R <sub>6</sub>	VAL vagy THR,
R <sub>7</sub>	ASP, PHE vagy TYR,
R <sub>8</sub>	PRO,
R <sub>9</sub>	ARG,
R <sub>10</sub>	LEU vagy THR,
R <sub>11</sub>	ILE vagy deléció,
R <sub>12</sub>	ASN, és
	ahol
-COOH	karboxil-terminális vég; és

b) a dezoxi-ribonukleinsav szekvencia expresszióját irányító promoter; és

B/ az A) szerinti módon transzformált gazdasejtet tenyésztjük olyan körülmények között, ahol az adott dezoxi-ribonukleinsav szekvencia expressziója bekövetkezik.





A fenti módszert és a használt dezoxi-ribonukleinsavakat az alábbiakban részletesen ismertetjük.

A fentiekben ismertetett, új C protein zimogén alakok előállítására dezoxi-ribonukleinsav konstrukciókat használunk. Ezek az új molekulák olyan pre-propeptidet kódolnak, amely a szekréciót szabályozó szignálpeptidből és egy gamma-karboxilezett protein propeptid részéből (ez utóbbi a K vitamin-igényű karboxiláz hatására jön létre) áll. Ilyen propeptid szekvenciákat ismerünk a szakirodalomból: lásd például Suttie és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 634 - 637. (1987). Előnyösen és a könnyű előállítás érdekében mind a szignálpeptidet, mind pedig a propeptidet meghatározó nukleotid szekvenciát egy gamma-karboxilezett protein pre-propeptid aminosav szekvenciájából származtatjuk. Ilyen gamma-karboxilált protein például - de nem limitálón - a VII, IX, X faktorok, a protrombin, az S protein, a Z protein és a C protein. A találmány szerinti eljárás során a vektorokba előnyösen a humán C protein pre-propeptidjét meghatározó dezoxi-ribonukleinsav szekvenciát használjuk.

A találmány szerinti dezoxi-ribonukleinsav molekulák tartalmazzák továbbá a humán C protein könnyű láncát meghatározó szekvenciát, mégpedig közvetlenül 3'-irányban, és leolvasási fázisban a pre-propeptidet kódoló szekvenciához képest. A humán C protein könnyű lánc tartalmazza a 43 - 197.



aminosavakat, ahogy azt a naszcensz C protein ismertetésekor az előzőekben megadtuk. A K vitamin dependens plazma proteinek aminoterminális részei, ahogy a C protein könnyű láncának aminoterminális része is kalciumionokat kötő helyekkel rendelkezik. Ezeknek a plazmaproteineknek, mint például a VII, IX, X faktorok, a protrombin és az S protein, kalciumion kötő doménjeit hasonlóképpen használjuk, mint a humán C protein könnyű láncának kalciumion kötő doménjét (lásd a 0215548A1 sorszámú európai szabadalmi leírás 12. és 13. oldalát).

A találmány szerinti dezoxi-ribonukleinsav molekulák tartalmazzák a LYS-ARG (KR) dipeptid kódoló szekvenciáját, mégpedig közvetlenül szomszédosan, 3'-irányban, és transzlációs leolvasási fázisban a könnyű láncot meghatározó szekvenciával. A naszcensz proteinben a dibázikus dipeptid, mint például a LYS-ARG a könnyű lánc karboxilterminális végén helyezkedik el. A LYS-ARG dipeptid orientációja az expresszált proteinben a találmány céljainak nem felel meg. A találmány céljainak szempontjaiból a LYS-LYS vagy az ARG-ARG dibázikus dipeptidek ekvivalensek a LYS-ARG dipeptiddel. A találmány szerinti eljárásban azonban előnyösen a LYS-ARG dipeptidet használjuk, amely dipeptid jelen van a természetes humán C proteinben.



A LYS-ARG dipeptidet meghatározó kodonoktól közvetlenül 3'-irányban helyezkedik el az aktivációs peptidet meghatározó szekvencia. A találmány szerinti molekulákban megváltoztattuk az aktivációs peptid kódoló szekvenciáját, és a nehéz lánc első három aminosavát meghatározó szakaszt (és a megfelelő aminosav szekvenciát), és ez felelős elsősorban ezeknek az új zimogéneknek a megnövekedett trombin érzékenységeért.

A témában jártas szakemberek felismerik, hogy a találmány szerinti zimogén alakok különböznek a humán C protein természetes zimogén alakjaitól, ahogy azt az alábbiakban ismertetjük. A természetes humán C protein molekulában az aktivációs peptid és a nehéz lánc első három aminosava az alábbi szekvenciájú:

200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214  
ASP-THR-GLU-ASP-GLN-GLU-ASP-GLN-VAL-ASP-PRO-ARG-LEU-ILE-ASP,

ahol az aminosavak feletti számok a naszcensz humán C proteinben levő aminosav sorrendeket jelölik. A jelen leírásban megadjuk, hogy különböző aminosavak megváltoztatásával olyan megfelelő zimogén alakot kapunk, amely könnyebben hasítható, azaz érzékenyebb a trombinra, ezenkívül érzékenyebb a trombin-trombomodulin komplexszel bekövetkező hasítással szemben is.

A találmány szerinti különböző aminosav deléciók és helyettesítések eredményeképpen olyan mutáns alakok jönnek létre, amelyekből kapott zimogének a jelzett trombin érzékenységgel rendelkeznek. A "kapott zimogének" kifejezés alatt azt értjük, hogy bár a helyettesítéseket a naszcenzs humán C protein aminosav szekvenciája kapcsán közöljük, ennek a naszcenzs humán C proteinnak először szekretálódnia kell (amely során az 1 - 42. aminosavak lehasadnak), zimogén alak kialakulása érdekében. A 214. helyen levő aszparaginsavat (az aktivációs peptidben) helyettesítve a naszcenzs humán C protein esetén aszparaginnal megkapjuk a találmány szerinti új zimogént. Egy aminosav deléciója (inkább, mint helyettesítése) szintén új C protein zimogén alakokat eredményez. A jobb megértés és a számozhatóság érdekében a deléciót nullával (0) jelöljük. Amikor egy aminosav kiesik, a deléciót szenvedett szakasz mindkét végén levő aminosavak kapcsolódnak a folyamatos zimogén lánc kialakítására. Az I. táblázaton megadjuk a találmány szerinti különböző új C protein zimogén alakokat.

I. T Á B L Á Z A T

Zimogén alak<sup>x</sup>

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>	R <sub>10</sub>	R <sub>11</sub>	R <sub>12</sub>
Természetes C protein	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214
N	ASP	GLN	GLU	ASP	GLN	VAL	ASP	PRO	ARG	LEU	ILE	ASP
FN	ASP	GLN	GLU	ASP	GLN	VAL	ASP	PRO	ARG	LEU	∅	ASN
SC	LEU	HIS	LYS	LEU	GLN	VAL	TYR	PRO	ARG	THR	∅	ASN
LIN	ASP	GLN	GLU	ASP	GLN	VAL	ASP	PRO	ARG	LEU	ILE	ASN
FLIN	ASP	GLN	GLU	ASP	GLN	VAL	PHE	PRO	ARG	LEU	ILE	ASN

<sup>x</sup> = A helyettesítéseket és a deléciókat aláhúzással jelöljük.





A találmány szerinti humán C protein előnyös új zimogén alakjai tehát a naszcensz humán C protein szekretálódása és processzálása révén jönnek létre, a molekula aminosav szekvenciáját az alábbiakban adjuk meg:

H<sub>2</sub>N-MET TRP GLN LEU THR SER LEU LEU LEU PHE VAL ALA THR TRP GLY ILE  
10 SER GLY THR PRO ALA PRO LEU ASP SER VAL PHE SER SER SER GLU ARG  
ALA HIS GLN VAL LEU ARG ILE ARG LYS ARG ALA ASN SER PHE LEU GLU  
GLU LEU ARG HIS SER SER LEU GLU ARG GLU CYS ILE GLU GLU ILE CYS  
15 ASP PHE GLU GLU ALA LYS GLU ILE PHE GLN ASN VAL ASP ASP THR LEU  
ALA PHE TRP SER LYS HIS VAL ASP GLY ASP GLN CYS LEU VAL LEU PRO  
LEU GLU HIS PRO CYS ALA SER LEU CYS CYS GLY HIS GLY THR CYS ILE  
20 ASP GLY ILE GLY SER PHE SER CYS ASP CYS ARG SER GLY TRP GLU GLY  
ARG PHE CYS GLN ARG GLU VAL SER PHE LEU ASN CYS SER LEU ASP ASN  
25 GLY GLY CYS THR HIS TYR CYS LEU GLU GLU VAL GLY TRP ARG ARG CYS  
SER CYS ALA PRO GLY TYR LYS LEU GLY ASP ASP LEU LEU GLN CYS HIS  
PRO ALA VAL LYS PHE PRO CYS GLY ARG PRO TRP LYS ARG MET GLU LYS  
30 LYS ARG SER HIS LEU LYS ARG ASP THR GLU R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> R<sub>4</sub> R<sub>5</sub> R<sub>6</sub>  
R<sub>7</sub> R<sub>8</sub> R<sub>9</sub> R<sub>10</sub> R<sub>11</sub> R<sub>12</sub> GLY LYS MET THR ARG ARG GLY ASP SER PRO  
35 TRP GLN VAL VAL LEU LEU ASP SER LYS LYS LYS LEU ALA CYS GLY ALA  
VAL LEU ILE HIS PRO SER TRP VAL LEU THR ALA ALA HIS CYS MET ASP  
GLU SER LYS LYS LEU LEU VAL ARG LEU GLY GLU TYR ASP LEU ARG ARG  
40 TRP GLU LYS TRP GLU LEU ASP LEU ASP ILE LYS GLU VAL PHE VAL HIS  
PRO ASN TYR SER LYS SER THR THR ASP ASN ASP ILE ALA LEU LEU HIS



LEU ALA GLN PRO ALA THR LEU SER GLN THR ILE VAL PRO ILE CYS LEU  
PRO ASP SER GLY LEU ALA GLU ARG GLU LEU ASN GLN ALA GLY GLN GLU  
THR LEU VAL THR GLY TRP GLY TYR HIS SER SER ARG GLU LYS GLU ALA  
LYS ARG ASN ARG THR PHE VAL LEU ASN PHE ILE LYS ILE PRO VAL VAL  
PRO HIS ASN GLU CYS SER GLU VAL MET SER ASN MET VAL SER GLU ASN  
MET LEU CYS ALA GLY ILE LEU GLY ASP ARG GLN ASP ALA CYS GLU GLY  
ASP SER GLY GLY PRO MET VAL ALA SER PHE HIS GLY THR TRP PHE LEU  
VAL GLY LEU VAL SER TRP GLY GLU GLY CYS GLY LEU LEU HIS ASN TYR  
GLY VAL TYR THR LYS VAL SER ARG TYR LEU ASP TRP ILE HIS GLY HIS  
ILE ARG ASP LYS GLU ALA PRO GLN LYS SER TRP ALA PRO-COOH,

ahol

- R<sub>1</sub> ASP vagy LEU,
  - R<sub>2</sub> GLN vagy HIS,
  - R<sub>3</sub> GLU vagy LYS,
  - R<sub>4</sub> ASP vagy LEU,
  - R<sub>5</sub> GLN,
  - R<sub>6</sub> VAL vagy THR,
  - R<sub>7</sub> ASP, PHE vagy TYR,
  - R<sub>8</sub> PRO,
  - R<sub>9</sub> ARG,
  - R<sub>10</sub> LEU vagy THR,
  - R<sub>11</sub> ILE vagy egy deléció,
  - R<sub>12</sub> ASN és ahol
- COOH a karboxilterminális vég.



A témában jártasak felismerik, hogy a genetikai kód degeneráltsága miatt különböző dezoxi-ribonukleinsav molekulák kódolhatják a fentiekben megadott polipeptidet. Ezért az alábbiakban leírt konstrukciókat és a példákban megadott előnyös dezoxi-ribonukleinsav szekvenciákat, vektorokat és transzformánsokat szemléltető példaként kell tekinteni, és nem limitálják a találmány oltalmi körét.

A találmány szerinti összes dezoxi-ribonukleinsav molekulát a humán C protein gén helyspecifikus mutagenézisével állítjuk elő. A mutagenizált, zimogént meghatározó molekulákat ezután eukarióta expressziós vektorokba építjük be, például úgy, hogy a zimogén gének expresszióját az adenovirus-2 nagyobb késői promotere szabályozza. A vektorok tartalmazzák a BK vírus P2 enhancerét is, mégpedig olyan elhelyezésben, hogy növelje a promoter expressziós működését. A vektorokat *Escherichia coli* K12 AG1 sejtekbe transzformáljuk, és a törzseket letétbe helyezzük. A letétbehelyezés az alábbi törzsgyűjteményben történt: Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Illinois 61604. A II. táblázatban megadjuk az egyes tenyészeteket, a deponálás dátumát és a deponálási sorszámot.





II. T Á B L Á Z A T

<u>T e n y é s z e t</u>	<u>Letéti szám</u>	<u>A letét dátuma</u>
E. coli K12 AG1/pLPC-N	NRRL B-18612	1990. 01. 09.
E. coli K12 AG1/pLPC-FN	NRRL B-18613	1990. 01. 09.
E. coli K12 AG1/pLPC-SC	NRRL B-18614	1990. 01. 13.
E. coli K12 AG1/pLPC-LIN	NRRL B-18615	1990. 01. 13.
E. coli K12 AG1/pLPC- -FLIN	NRRL B-18616	1990. 01. 13.

-----

A tenyészeteket és a plazmidokat ismert technikákat használva kaptuk, a plazmidokat közvetlenül transzformálhatjuk eukarióta gazdasejtekbe, a humán C proteín zimogén alakjainak az előállítására. Előnyösen úgy járunk el, hogy a plazmidokat az adenovirus E1A azonnali-korai géntermékét expresszáló gazdasejtekbe transzformáljuk, amelyekben a BK enhancer a vektoron úgy helyezkedik el, hogy az expresszió erősítése leghatékonyabban az E1A jelenlétében történjen meg. A témában jártas szakemberek tudják, hogy több gazdasejt expresszál vagy expresszálóvá tehető egy nagyméretű dezoxi-ribonukleinsav vírus korai géntermékének a termelésére. Az előnyös sejtvonalak a humán vese 293 sejtvonal (beszerezhető az American Type Culture Collection törzsgyűjteményéből ATCC CRL 1573 sorszám), vagy a szíriai hörcsög sejtvonal (AV12), amelyet ATCC 9595 sorszám



helyeztek letétbe. A legelőnyösebb az embrióból nyert humán vese sejtvonala (293 számu).

Az előbbinél magasabb szintű expressziót érhetünk el, ha a C protein különböző zimogén alakjait kódoló géneket a letétbe helyezett vektorokból kivágjuk, és a GBMT transzkripciós szabályozó egységet tartalmazó vektorba ligáljuk. A GBMT egység szabályozása alatt álló natív humán C protein szekvenciát hordozó pGTC plazmidot E. coli K12 AG1 törzsből izolálhatjuk, amit NRRL B-18593 sorszámon szerezhethetünk be. A természetes gént a plazmidból vágjuk ki, ami utóbbit E. coli dam<sup>-</sup> törzsből izolálunk. A kihasítás BclI enzimmel történik. Az új zimogén gének mindegyike kihasítható a megfelelő plazmidból BclI emésztéssel. Ugyanakkor, a tisztított és defoszforilezett vektorba ezután a találmány szerinti összes új zimogén gén BclI enzimmel beépíthető. Az új zimogén géneket hordozó plazmidokban a gének a GBMT transzkripciós egység mögött helyezkednek el, expresszióra ezeket transzformáljuk a 293 sejtvonala sejtjeibe, a sejteket tenyésztjük, és az új zimogéneket izoláljuk a tenyészetből, a szakemberek körében jól ismert technikákat alkalmazva. A humán C protein sejttenyészetből való izolálásának egy módszerét ismerteti a 0363126 számu, 1990. 04. 11-én közzétett európai szabadalmi leírás, amit referenciaként a leírásba beépítünk.



A találmány szerinti eljárással előállított vegyületek közé tartoznak a találmány szerinti naszcenz proteinek szekretálódásakor felszabaduló zimogén alakok is. A találmány szerinti vegyületek a C protein zimogén alakjainak aktiválásakor képződő aktivált C protein-származékok is. Így a találmány szerinti vegyületek közé tartozik a kódoló szekvenciákat hordozó dezoxi-ribonukleinsav, ezeknek a szekvenciáknak a kifejezését irányító expressziós vektorok, a kódoló szekvenciák transzkripciójaker létrejövő mRNS translációjaker keletkező naszcenz proteinek, ezen naszcenz proteinek szekretálódásakor képződő zimogének és bizonyos zimogének aktivált származékai. A találmány szerinti dezoxi-ribonukleinsavakat kémiaiilag is szintetizálhatjuk, vagy restrikiós fragmenseket kombinálhatunk, vagy kombinálhatjuk a szakterületen használatos technikákat. Dezoxi-ribonukleinsavat szintetizáló készülékek ismertek, és felhasználhatók a találmány szerinti vegyületek elkészítésére.

A találmány szerinti eljárásban használt illusztrativ értékü vektorok tartalmazzák a BK enhancert, amely ugy helyezkedik el, hogy az adenovirus nagyobb késői promoterével stimulálja a találmány szerinti kódoló szekvencia transzkripcióját. A témában jártasak tudják, hogy nagyszámu eukarióta promoter, enhancer és expressziós vektor ismert és használható fel a találmány szerinti eljárásban.



A témában jártas szakemberek azt is tudják, hogy az eukarióta expressziós vektor enhancer elem nélkül is működik. A találmány szerinti eljárás kulcs-felismerése nem korlátozódik egy adott enhancerre, vagy bármelyre, vagy a C protein zimogén alakjának expresszióját szabályozó promoterre, hanem elsősorban az új kódoló szekvenciára és ezen szekvencia által meghatározottan termelődő, megfelelő proteinekre.

Ugyanakkor, az egyes vektor elemek kiválasztása, például a promoterek, enhancerek és szelektálható markerek használata nagy jelentőségű az eukarióta gazdasejt által termelt protein mennyiségére. A 0245949 számú, 1987. 11. 19-én közzétett európai szabadalmi leírásban - amit itt referenciaként említünk - több expressziós vektort ír le a természetes C protein zimogén termeléséhez, a vektorokban a naszcensz humán C protein expresszióját BK enhancer által stimulált eukarióta promoter szabályozza. Ezekkel a vektorokkal különösen magas expressziós szintek érhetőek el akkor, ha olyan eukarióta sejtekbe transzformáljuk azokat, amelyek egy nagy dezoxi-ribonukleinsav vírus korai géntermékét is expresszálják, ilyen például az adenovirus E1A génterméke. Ahogy az a jelen leírásban ismertetett pGT-N, pGT-FN, pGT-SC, pGT-LIN és pGT-FLIN szemléltetésként megadott vektorokból kiderül, különösen előnyösen használható az, amelyben a géntermék expresszióját a GBMT-E1A szekvenciával oldunk meg.



A találmány szerinti eljárást nem limitáljuk egy adott eukarióta gazdasejt használatára. Jónéhány eukarióta gazdasejt áll rendelkezésre a törzsgyűjteményekben, mint például az American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD 20852, törzsgyűjteményben. Ezek a találmány szerinti vektorok felhasználására alkalmasak. Egy adott gazdasejt kiválasztása bizonyos mértékig attól függ, hogy melyik expressziós vektort használjuk a találmány szerinti dezoxi-ribonukleinsav kódoló szekvenciák közül a C protein expressziójára. Mivel a naszcensz humán C protein és a naszcensz humán C protein találmány szerinti származékai jelentős mértékű transzlációt követő módosulás révén változnak, bizonyos sejtvonalak előnyösebben használhatók a találmány szerinti vektorokkal. A 0245949 sorszámú európai szabadalmi leírásban és Grinnel és munkatársai dolgozatában /Bio/Technology, 5, 1189. (1987)/ a gamma-karboxilezett proteinek, például a humán C protein rekombináns sejtekkel való termelésére különösen előnyösen használnak adenovirussal transzformált humán embrió vesesejteket. Ilyen adenovirussal transzformált humán embrió vese sejtvonal a 293 sorszámú sejt, amit ATCC CRL 1573 sorszámmon szerezhethünk be. A 293 sorszámú sejtvonal előnyösen használható fel a találmány szerinti vektorokkal is.

Ugyanakkor, a gamma-karboxilezett proteinek, mint például a humán C protein zimogén alakjának előállítására



egy adenovirussal transzformált sejtvonalban nem limitálható az adenovirussal transzformált humán embrió vesesejtekre. Tény, hogy az adenovirus transzformált sejtek általában elfogadott gazdasejtek a gamma-karboxilezett humán C protein termelésére. Egy különösen előnyös sejtvonal ezen típusok között az AV12-664 (a továbbiakban: AV12 jellel jelöljük) sejtvonal, amelyet az ATCC törzsgyűjteményből ATCC CRL 9595 sorszámmon kaphatunk meg. Az AV12 sejtvonal előállítására a sziriai hörcsögöt a nyakán injekcióval humán adenovirus 12-vel fertőztük, és a kapott tumorból sejteket izolálunk. A későbbiekben megadott 3. példában ismertetjük mind a 293 sorszámú, mind pedig az AV12 sejtvonalak transzformációját a szemléltetésként megadott pGT-N vektorral.

A találmány szerinti vektorok egy sor eukarióta sejtbe transzformálhatók, ott expresszálhatók, különösen előnyös gazdasejtként az emlős sejt. A találmány szerinti, a stabil eukarióta transzformánsok izolálására és azonosítására használt szelektálható markert nem tartalmazó vektorok nemcsak közvetlen transzformációs célokra használhatók fel, de kotranszformációra is, ami utóbbi technikát a 4,399,216 számú, 1983. augusztus 26-án közzétett amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetnek. A találmány szerinti vektorok tartalmazhatnak E. coli sejtekben replikációt megengedő szekvenciákat is, mivel általában a plazmid dezoxi-ribonukleinsav izolálása

jóval hatékonyabb E. coli sejtekből, mint más gazdasej-  
tekből.

A találmány szerinti vektorokban levő humán  
C proteint meghatározó szekvencia kifejezése olyan gazdasej-  
tekben történik meg, amelyekben promoter kapcsolódik a  
strukturgénhez. A találmány szerinti eljárásban használ-  
ható gazdasejtek közül néhányat, a megfelelő megjegyzések-  
kel együtt, a III. táblázatban sorolunk fel.



III. T Á B L Á Z A T

Gazdasejt	E r e d e t	Letéti szám	M e g j e g y z é s
HepG-2	humán máj hepatoblasztóma	*ATCC # HB 8065	a 4,393,133 sz. USA-leírás ismerteti ennek a sejtvonalnak a vonalától
CV-1	afrikai zöld majom vese	ATCC # CCL 70	
LLC-MK <sub>2</sub>	eredeti Rhesus majom vese	ATCC # CCL 7	
LLC-MK <sub>2</sub> szár- mazék	Rhesus majom vese	ATCC # CCL 7.1	gyorsabban nő, mint az ATCC # CCL 7 sejtvonal
3T3	egér embrió fibroblasztok	ATCC # CCL 92	
CHO-K1	kinai hörcsög petefészek	ATCC # CCL 61	prolin-igényű. A CHO-K1 származékai, mint a dhfr <sup>-</sup> DXB11 származék, ebből a gazdasejtvonalból előállítható.
HeLa	humán nyaki epitheloid	ATCC # CCL 2	
RPMI8226	humán mielóma	ATCC # CCL 155	szekretálja az IgG lambda-típusú könnyű láncot.
H4IIEC3	patkány hepatóma	ATCC # CRL 1600	Ebből a sejtvonalból állíthatók elő a származékok, mint a 8-azaguanin rezisztens FAZA gazdasejtek





III. TÁBLÁZAT

(folytatás)

C127I	egér fibroblaszt	ATCC 77 CRL 1616
HS-Sultan	humán plazma sejt plazmocitóma	ATCC 77 CRL 1484
BHK-21	hőrsög vese	ATCC 77 CCL 10

48

\* = American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive,  
Rockville, Maryland 20852-1776.



Ahogy az a III. táblázatból kiderül, sok emlős gazdasejt rendelkezik a szükséges sejtméchanizmussal a találmány szerinti naszcenz proteinek szignálpeptidjének felismerésére és megfelelő szintézisére. Ezek a sejtek alkalmasak a transzlációt követő szükséges módosítások elvégzésére, például a glikozilezésre, gamma-karboxilezésre és béta-hidroxilezésre, ahogy ez megfigyelhető a vérplazmában jelenlevő humán C protein esetén. Ugyanakkor, ahogy azt az előzőekben jeleztük, az optimális humán C protein transzlációt követő processzálása adenovirussal transzformált sejtekben következik be. Az alábbiakban ismertetett nagyszámu vektor áll rendelkezésre ilyen eukarióta gazdasejtek transzformálására, azonban a példaként alább megadott specifikus vektorok nem korlátozzák a jelen találmányt.

A pSV2 típusu vektorok az alábbi szegmensekből állnak: tartalmaznak egy definiált eukarióta transzkripció egységet - promotert - (ep) tartalmazó SV40 genom szegmenst, egy köztes szekvenciát (IVS), továbbá egy poliadenil (pA) helyet. Az SV40 T-antigén hiányában a pSV2 típusu plazmid vektorok úgy transzformálódnak az emlős és más eukarióta sejtekbe, hogy integrálódnak a gazdasejt kromoszómális dezoxi-ribonukleinsavába. Egy sorozat pSV2 típusu plazmid vektort állítottak elő /lásd a Gluzman által szerkesztett könyvet: Eukaryotic Viral Vectors, kiadó: Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York (1982)/, mint például



a pSV2-gpt, pSV2-neo, pSV2-dhfr, pSV2-hyg, továbbá a pSV2-béta-globin; ezekben a vektorokban a beépített gén transzkripcióját az SV40 promoter szabályozza. Ezek a vektorok alkalmasak a találmány szerinti kódoló szekvencia kifejezésére, és az alábbi törzsgyűjteményből szerezhetők be: American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, Maryland, vagy Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Peoria, Illinois.

A pSV2-dhfr plazmid (ATCC 37146) egy egér dihidrofolát reduktáz (dhfr) gént tartalmaz, amely az SV40 korai promoter szabályozása alatt áll. Megfelelő körülmények között a dhfr gén sokszorozódik, vagy beépül a gazdasejt kromoszómájába. Ez a sokszorozódás /lásd Schimke, Cell, 37, 705 - 713. (1984)/ a dhfr génnel szomszédos dezoxi-ribonukleinsav szekvenciákat is érinthet, mint például a találmány szerinti naszcensz humán C proteint kódoló szekvenciát, és így bekövetkezhet a találmány szerinti C protein zimogénjeinek fokozott termelése. Az emlős és más eukarióta gazdasejtekben a naszcensz C protein és a C protein zimogének expressziójára felhasznált plazmidokban különböző promoterek lehetnek. A leírásban megadott eukarióta promoterek csak példaként szerepelnek, nem limitálják az oltalmi kört. Az alábbi promotereket izolálhatjuk és módosíthatjuk a humán C protein zimogénjeinek eukarióta gazdasejtekben való rekombinációs expressziójára: SV40 késői promoter vagy a Bucher



és munkatársai által tárgyalt eukarióta promoterek /Nucl. Acids. Res., 14 (24), 1009. (1986)/; használhatunk továbbá eukarióta géneket szabályozó promotereket, például az alábbi géneket: az ösztrogénnel indukálható csirke ovalbumin gén, az interferon gének, a glükokortikoiddal indukálható tirozin aminoszferáz gén, a timidin-kináz gén és az adenovirus génjeinek nagyobb korai és késői promotereit. Az eukarióta promotereket tandem elrendeződésben is használhatjuk a találmány szerinti kódoló szekvencia expressziójának szabályozására. Ezenkívül nagyszámu retrovirus ismeretes, amelyek nagyszámu eukarióta gazdasejt frtőzésére képesek. A retrovirus dezoxi-ribonukleinsavának hosszú ismétlődő végei gyakran promoter-aktivitást határoznak meg, és így a találmány szerinti dezoxi-ribonukleinsavban kódolt információk expressziójának szabályozására használhatók.

A pRSVcat (ATCC 37152) plazmid a Rous sarcoma virus (RSV) hosszú végelhelyezkedésű ismétlődő szakaszát tartalmazza; ez a virus csirke vagy más gazdasejtek fertőzésére képes. Az RSV terminális ismétlődő szekvenciákat a pRSVcat plazmid 0,76 kb nagyságu NdeI-HindIII restrikciós fragmenséről izolálhatjuk. Az RSV ismétlődő végszekvencián levő promoter /Gorman és munkatársai, P.N.A.S., 79, 6777. (1982)/ előnyösen használható fel a találmány szerinti vektorokban is. A pMSVi plazmid (NRRL B-15929) az egér szarkóma virus (MSV) hosszú ismétlődő végszekvenciáit tartalmazza, ez



a vírus egér vagy más sejteket fertőz. A találmány szerinti vektorokban ez az ismétlődő szekvencia promoterként használható fel. Az egér metallothionein (MMT) promoter szintén felhasználható eukarióta gazdasejtekben, és ezért a találmány szerinti vektorokban is előnyösen alkalmazható. Az MMT promoter a p $\delta$ BPV-MMTneo plazmid (ATCC 37224) 15 kb nagyságu fragmensén található, ez kiindulási anyagként használható a találmány szerinti más plazmidok előállításakor.

A leírásban szemléltető jelleggel szereplő dezoxi-ribonukleinsav szekvenciák és plazmidok számtalan módosítása és variációja lehetséges. A genetikai kód degeneráltsága például megengedi a polipeptidet kódoló régió teljes hosszában a báziscserét, ugyanez érvényes a transzlációs stop jelre. Ezeknek a változtatásoknak nincs következménye a kódolt polipeptid szekvenciára. Megfelelő, cserélhető szekvenciákat leírhatunk a humán C protein ismert aminosav vagy dezoxi-ribonukleinsav szekvenciájából kiindulva, és ezeket előállíthatjuk ismert szintetikus vagy helyspecifikus mutagenézis módszerekkel. A szintetikus módszereket lényegében Itakura és munkatársai /*Science*, 198, 1056. (1977)/és Crea és munkatársai /*PNAS*, USA, 75, 5765. (1978)/ eljárása szerint vitelezhetjük ki. Fentiek alapján a találmányt nem limitáljuk a példaként megadott dezoxi-ribonukleinsav szekvenciákra és plazmidokra.

Miután a találmány szerinti egyik vektort eukarióta gazdasejtbe transzformáltuk, egy szelektálható fenotípus alapján transzformánsokat választhatunk ki. Ez a szelektálható fenotípus az expressziós vektorban jelenlevő szelektálható markerből eredhet, vagy a gazdasejtbe juttatott expressziós vektorral együtt transzformált, másik vektorban lehet jelen. Amiután a transzformánsokat szelektáltuk, előnyös, ha meghatározzuk, mely transzformánsok expresszálják az expressziós vektorban meghatározott, adott proteint a legnagyobb mennyiségben. Ez a mérés különösen fontos akkor, ha kotranszformációt végeztünk, ugyanis ekkor számtalan olyan transzformánst kapunk, amelyek csak a szelektálható markert hordozó plazmidot tartalmazzák, és nem hordozzák az expressziós vektort. Az alábbiakban ismertetett 3. és 4. példában megadott eljárás nemcsak arra alkalmas, hogy azonosítsuk az adott proteint expresszáló és szekretáló sejteket, de alkalmas arra is, hogy összehasonlítsuk az egyes vizsgált sejtek szekretált proteinjének mennyiségét. A megadott módszer lehetővé teszi az adott proteinnél a legtöbbet termelő és szekretáló élő sejtek izolálását is.

A humán C protein zimogén alakjainak aktiválása kapcsán régóta jól ismert módszerek állnak rendelkezésünkre. A C protein egyedül trombinnal aktiválható, aktiválható trombin/trombomodulin komplexszel, a Russell-féle viperaméreggel, vagy több, más módon. A találmány szerinti



zimogének különböző aktivációs fokának összehasonlítására trombint használtunk, 3 mmól kalcium-diklorid vagy 8 mmól etilén-diamino-tetraecetsav jelenlétében. A trombin aktivációt és a C protein-aktivitás mérését (amidolitikus és anti-koaguláns hatás) Grinnell és munkatársai szerint végeztük /Biotechnology, 5, 1189 - 1192. (1987)/, ezt a módszert a leírásba referenciaként építjük be. A C protein aktiválásának másik módszere szerint immobilizált trombint használunk (Yan, 07/403,516 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; No. X-7307, 1989. szeptember 5.). A IV. táblázatban megadjuk az aktiválás relatív mértékeit.

IV. T Á B L Á Z A T

Zimogén alak	Trombin (3 mmól kalcium- -diklorid)	Trombin (8 mmól EDTA)
Vad típus	1	1
F167	20	2
LIN	3	1,3
FLIN	30	3
FN	~ 450	5-6
SC	~ 260	5-6



Az F167 zimogén a vad típusu aktivációs peptidet tartalmazza, de a 209. helyen levő aminosav (aszparaginsav) fenil-alaninná cserélődött. Az F167 zimogént a 0323149 számú, 1989. július 5-én közzétett európai szabaddalmi leírásból ismerjük meg. Az F167, LIN és FLIN zimogén mutánsok funkcionális antikoaguláns aktivitása a vad típusu kontrollhoz képest 100 - 109 %. Az FN és SC mutánsok aktivitásai a kontroll aktivitás kevesebb mint 10 %-át mutatják az alacsony amidolitikus aktivitásnak megfelelően.

Az aktivált C proteinek jelentős antitrombotikus hatása van, ez az intravénás trombusok, az artériás trombusok keletkezésének és kiterjedésének meggátlásában jelentkezik, továbbá gátolja a Gram negatív baktériumok okozta fertőzések esetén fellépő halált, vagy a szervek sérülését, az endotoxémiát és a kiterjedt intravaszkuláris koagulációt. Állatkísérletekben a természetes C protein zimogénjének infúziójakor nem mutatkozott hatás a Gram negatív kórokozók okozta szeptikémia és sokk kezelésekor, nem mutatkozott hatás a kiterjedt intravaszkuláris koagulációban sem. Ezek a negatív eredmények azt jelzik, hogy a kiterjedt mikrovaszkuláris trombózisnak ebben a formájában, amikor jelentős trombin keletkezik, nem kellő mennyiségű trombo-modulin van jelen a vérben ahhoz, hogy a trombinnal komplexet képezzen, és aktiválja az infúzióval adagolt zimogént.





Az aktivált C protein legnagyobb hátránya, hasonlóan más aktivált szerin proteázokhoz az, hogy fél élet időtartama ( $T_{1/2}$ ) rövid a zimogén prekursorokhoz képest. A  $T_{1/2}$  kutyákban 11 percnél mutatkozott, majmokban 22 - 26 percet mértek. Összehasonlítva, a természetes C protein zimogén fél életideje emberben 6 óra. Az aktivált szerin proteázok, például a C protein aktivált alakja rövidebb biológiai fél élettartammal rendelkezik, mint a megfelelő zimogénjeik, ennek oka komplex és celluláris és humorális mechanizmusokra vezethető vissza. Az aktivált szerin proteázok komplexeket képeznek a plazmában normális körülmények között jelenlevő szerin proteáz inhibitorokkal is. Az aktivált C protein (APC) komplexei egy újonnan leírt APC inhibitorral, továbbá az alfa-2-makroglobulinnal komplexeket képeznek. Ugyanakkor, az inaktív zimogének, ideértve a találmány szerinti C protein zimogénjeit, a szerin proteáz inhibitorokkal nem reagálnak.

A találmány szerinti C protein zimogén alakjainak előnye az, hogy trombinnal jobban aktiválható, mint a természetes C protein zimogén, mivel kalciumionok jelenlétében ezen zimogének aktiválásához a trombin nem igényli a trombomodulinnal való komplexképzést. Ebből az következik, hogy ezek a C protein zimogének, adagolást követően, az intravaszkuláris trombinképződés helyén aktivizálódnak, azaz



mindenhol, ahol intravaszkuláris trombusképződés zajlik. Így a C protein rekombináns zimogénjeit gyógyszerként használhatjuk, ezek a vegyületek a trombinképződés helyén aktivizálódnak. Mivel ezek a trombin-érzékeny zimogének zimogén alakban adagolhatók, nem képeznek komplexet a C protein inhibitoraival, és ezért a természetes C protein zimogénjeivel azonos fél életidővel rendelkeznek.

A találmány szerinti rekombináns C protein zimogének felhasználhatók több fontos betegség kifejlődésének meggátlására és kezelésére, ideértve az intravaszkuláris koagulációt, közte a mélyvénás trombózist, a tüdőembóliát, a perifériás artériás trombózist, a szivben végbemenő embóliát vagy a perifériás artériák embolitikus elváltozását, az akut miokardiális infarktust, a trombotikus sokkokat, a disseminált intravaszkuláris koagulációt. Ezeket a C protein-származékokat hatásosan használhatjuk fel azoknak a betegeknek a kezelésére, akik heterozigózisból eredő C protein-hiányban szenvednek, aminek következménye lehet a mélyvénás trombózis. A homozigózisból eredő C protein-hiányban szenvedő betegek purpura fulminans kezelésében is előnyösen alkalmazhatók a fenti származékok.

Kísérleti és klinikai adatok jelzik, hogy az ismert véralvadásgátlók, különösen a warfarin előnyösen alkalmazható egyes rákok kiterjedésének kezelésére, és ezek

az anyagok gátolják vagy csökkentik a tumorok metasztázisos lézióit. Közismert, hogy gyulladásos hatások, mint például endotoxinok, a tumor nekrozis faktor és az interleukin 1 eltávolítja a trombomodulint az endotéliás sejtek felületéről, ami viszont mikrovaszkuláris és makrovaszkuláris trombózist eredményez. A találmány szerinti rekombináns C proteín zimogénjei egy attraktív alternatívát képviselnek ezen klinikai szituációk konvencionális antikoagulánsokkal való kezelésének palettáján.

Az aktivált C proteín látványos terápiás indikációját jelenti a mélyvénás trombózis és a tüdőembólia kezelése, ezt ma alacsony dózisu heparinokkal kezelik. A zimogének további előnye, hogy injekcióként adhatók, inkább, mint állandó intravénás infúziókként. Az aktivált C proteint folyamatos intravénás infúzióban kell adagolni, mivel ennek a proteinnak a biológiai fél élettartama rövid.

A találmány szerinti C proteín zimogénjeinek infúziójakor kisebb valószínűséggel következnek be komplikációk. Ezért ezeket a zimogéneket a heparin helyett adagolhatjuk a tromboektómiával vagy embolektómiával összefüggő műtét előtti és utáni státuszokban, ezek a műtétek gyakran szükségesek akut artériás elváltozásokkor az amputáció megelőzésére. Mivel az aktivált C proteínhez



képest fél életidőtartamuk hosszu, továbbá, mivel viszonylag könnyebben adagolhatók, ezeket a zimogéneket a szivből eredő artériás embóliák kezelésekor előnyösebben használhatjuk, mint az aktivált C proteint. Ezeket a zimogéneket a kialakult mélyvénás trombózis és tüdőembólia kezelésekor alkalmazott dózisban hosszu időn át adagolhatjuk a szivembólia megelőzésére és gátlására.

A találmány szerinti C protein zimogének ugyancsak felhasználhatók a perifériás artériákban megjelenő trombusok miatt fellépő embólia kezelésére, amely tüneteket a jelenleg használt szerekkel nem lehet kellő mértékben kezelni, ideértve a vérlemezkék funkcióját szuppresszáló gyógyszereket, az orális antikoagulánsokat vagy ezek kombinációit. Mint a szivembólia esetén, ezeket a zimogéneket hosszu időn át adagolhatjuk a szivartériákban keletkező trombusok miatt fellépő embólia gátlására, embóliás sokkokban.

A találmány szerinti C protein zimogénjeit előnyösen használhatjuk trombotikus vérzésekben. Manapság az agyvérzést általában nem kezelik konvencionális antikoagulánsokkal. Az agyvérzések kezelése heparinnal vagy orálisan adagolható antikoagulánsokkal, bár esetenként sikeres, azt a kockázatot hordozza magában, hogy az agy sérült területeire károsan hat, és ezzel a vérzéssel

együttjáró neurológiai sérüléseket fokozza. Mivel a találmány szerinti zimogének kismértékben okoznak komplikációkat, továbbá, mert hatásuk szelektív, agyvérzést szenvedett betegeknek adagolhatók, és igen hatásosan alkalmazhatók artériás trombusok lokális kiterjedésének gátlására, ezzel pedig csökkentjük a vérzésből adódó neurológiai elváltozásokat.

A találmány szerinti zimogéneket előnyösen használhatjuk az akut miokardiális infarktus kezelésére is, ugyanis aktiválva pro-fibrinolitikus tulajdonságokkal rendelkeznek. A zimogének adhatók szöveti plazminogén aktivátorral együtt a miokardiális infarktus akut fázisaiban. Miután a koronáriás trombus szétoszlott, a zimogéneket több napon át még tovább adagolhatjuk, az akut miokardiális reinfarktus gátlására.

A C protein aktivált alakja felhasználható a disszeminált intravaszkuláris koaguláció kezelésére. A heparin<sup>2</sup> és az orális antikoagulánsokat a disszeminált intravaszkuláris koagulációs tüneteket mutató betegeknek kiterjedt klinikai kísérletekben adagolták, az eredmények azonban kétségesek. Ebben az állapotban a C protein aktivált alakja és a találmány szerinti zimogén alakok a konvencionális antikoagulánsokkal szemben előnyökkel rendelkeznek.



Ahogy azt a fentiekben megadtuk, állatkísérletekben bebizonyosodott, hogy a C protein zimogénje a Gram negatív mikroorganizmusok okozta fertőzések és a disszeminált intravaszkuláris koaguláció állapotában nem hatásos a halál és az egyes szervek sérüléseinek kezelésekor. Ezzel ellentétben, a találmány szerinti C protein zimogének, mivel igen érzékenyek a trómbin-aktiválásra, hatásosan alkalmazhatók a disszeminált intravaszkuláris koaguláció kezelésére.

A terjedő malignus tumorok kezelésekor használják az ismert antikoaguláns hatású gyógyszereket, különösen a warfarint. Sok tumor sejt olyan anyagokat termel, amelyek hatnak a koagulációs rendszer aktivációs mechanizmusára, és így lokális fibrin-lerakódások jelentkeznek. Ezek a fibrin-lerakódásokon a ráksejtek osztódnak, és metasztatizos állapotot okoznak. Ugyanakkor, a warfarint vagy más konvencionális antikoagulánst nem adagolhatunk intenzív és hatásos kemoterápiában, mivel ez a terápia a vörösvérsejtek számában jelentős esést okoz, és a trombocitopénia warfarin-terápiával együtt a páciens helyzetbe hozhatja. A találmány szerinti C protein-származékok, hasonlóan a C protein aktivált alakjaihoz, szelektívebben hatnak a konvencionális antikoagulánsoknál, és sokkal jobb terápiás indexszel rendelkeznek, mint a heparin vagy más, orális antikoagulánsok. Ezért relative biztonságosabban adagolhatók trombocitopéniás pácienseknek, így lehetővé válik a kiterjedő



rákban szenvedő betegek kezelése hatásos és intenzív kemo-  
terápia mellett a találmány szerinti C protein zimogénjei-  
vel.

A találmány szerinti zimogének és ezek ak-  
tivált párjai ismert módszerekkel formulázhatók gyógyszer-  
észeti szempontból elfogadható készítmények előállítására.  
A találmány szerinti humán C protein zimogének vagy aktivált  
C protein gyógyszerészeti szempontból elfogadható vivőanya-  
gokkal kombinálható. Előnyös vivőanyagokat és az ezekből ké-  
szült készítményeket, ideértve más, humán proteineket is,  
például a humán szérum albumint, például Remington's Pharma-  
ceutical Sciences 16. kiadásából ismerhetünk meg (Mack  
Publishing Co., 1980, Osol és munkatársai szerkesztésében).  
Ezt a szakirodalmat a leírásba referenciaként építjük be.  
A készítmények hatásos mennyiségű C protein zimogént vagy  
aktivált C protein zimogént tartalmaznak, megfelelő mennyi-  
ségű vivőanyaggal együtt, a gyógyszerészeti szempontból el-  
fogadható és hatásosan adagolható készítményekben. A C pro-  
tein készítmények parenterálisan adagolhatók, vagy bármely  
más, olyan módon, amely a hatásos vegyületet hatásos alakban  
a véráramba juttatja.

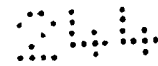
Megjegyezzük, hogy a találmány szerinti zimo-  
géneket felhasználhatjuk aktivált C proteinek in vitro elő-  
állítására is. Bár eukarióta sejtekben történő aktivált



C protein direkt előállítására rekombináns módszerekkel ismert, ezek a módszerek azt igénylik, hogy az aktivált C protein hosszú időn át a tenyészetben maradjon. Mivel a C protein aktivált alakja viszonylag instabil, ezek a direkt expressziós módszerek kismennyiségű aktivált C protein előállítását teszik lehetővé. A találmány szerinti zimogének ezzel szemben a trombinnal egymagában aktiválhatók, még kalciumionok jelenlétében is, és így jelentős előnnyel rendelkeznek az aktivált C protein előállítására kapcsán az ismert módszerekkel szemben.

Az alábbiakban szemléltető példákban adjuk meg a reprezentatív vegyületek, vektorok és transzformánsok előállítását, anélkül azonban, hogy ezzel a találmány oltalmi körét szűkítsük.





1. példa

A pLPC-FLIN plazmid izolálása

Az *E. coli* K12 AG1/pLPC-FLIN fagyasztva száritott tenyészetét a Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois 61604 törzsgyűjteményéből kaptuk NRRL B-18616 sorszámon. A fagyasztva száritott készítményt 10 ml alábbi összetételű LB táptalajban szuszpendáljuk:

Bacto-tripton	10 g
Bacto-élesztőkivonat	5 g
nátrium-klorid	10 g
viz	1 l.

A táptalaj pH-ját 7,5-re állítjuk be. A tenyészetet 2 órán át 32°C hőmérsékleten inkubáljuk, ezalatt a tenyészethez ml-enként 50 µg ampicillint adagolunk, majd egy éjszakán át 37°C hőmérsékleten folytatjuk a tenyésztést.

Az egy éjszakán át inkubált tenyészet egy kis részét LB agarra szélesztjük, az agar az LB táptalajjal azonos összetételű, de 15 g/l Bacto-agart is tartalmaz. A táptalajhoz 50 µg/ml ampicillint is adagolunk. A különálló telepek közül izoláljuk az *E. coli* K12 AG1/pLPC-FLIN törzset. A kiválasztott telepet 10 ml, ml-enként 50 µg ampicillint tartalmazó LB táptalajban tenyésztjük egy éjszakán át, 37°C hőmérsékleten, erőteljes rázás közben. 10 ml tenyészetet 500 ml, ml-enként 50 µg/ml ampicillint tartalmazó



LB táptalajhoz adunk, majd erőteljes rázás közben  $37^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten tenyésztünk addig, míg a tenyészet eléri a stationer fázist.

Az alábbiakat Maniatis és munkatársai szerint végezzük /Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982)/.

A tenyészetből centrifugálással összegyűjtjük a sejteket, a centrifugálást  $4^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten végezzük 10 percen át, 4000 g-vel. A felüluszt kiöntjük. A sejttöledéket 100 ml jéghideg, alábbi összetételű STE pufferral mossuk:

nátrium-klorid	0,1 mól
trisz-hidroklorid, pH = 7,8	10 mmól
EDTA	1 mmól.

A mosást követően a sejteket 10 ml oldat 1-ben újra szuszpendáljuk. Ennek az oldatnak az összetétele a következő:

glükóz	50 mmól
trisz-hidroklorid, pH = 8,0	25 mmól
EDTA	10 mmól.

Az oldatot 5 mg/ml lizozimmal egészítjük ki, és 10 percen át szobahőmérsékleten hagyjuk állni. Ezután 20 ml oldat 2-t adunk a lizozimmal kezelt sejtekhez. Az oldat összetétele a következő:

nátrium-hidroxid	0,2 n
nátrium-lauril-szulfát	1 %.



A szuszpenziót enyhén, a kémcsövet forgatva összerázzuk. Ezután 10 percen át jégfürdőben tartjuk a keveréket.

A lizált sejtkeverékhez 15 ml jéghideg, 5 mólos kálium-acetát-oldatot ( $\text{pH} = 4,8$ ) adunk, és a kémcső forgatásával összekeverjük az elegyet. 10 percen át jégfürdőben inkubálunk. A fentiekben megadott 5 mólos kálium-acetát-oldatot úgy állítjuk elő, hogy 11,5 ml jégacetet adunk 28,5 ml vízhez és 60 ml 5 mólos kálium-acetáthoz. Az így kapott oldat a káliumra számolva 3 mólos, és az acetátra számolva pedig 5 mólos.

A lizált sejteket tartalmazó elegyet Beckman SW27 rotorban (vagy ezzel egyenértékűben) centrifugáljuk, percenkénti 20.000 fordulatszámmal, 20 percen át,  $4^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten. A sejtek dezoxi-ribonukleinsava és a sejttermelék a centrifugacső alján gyülik össze. 36 ml felüluszt elkülönítünk, 0,6 térfogat izopropanolt adunk hozzá, összekeverjük az elegyet, és 15 percen át szobahőmérsékleten hagyjuk állni. A plazmid dezoxi-ribonukleinsav összegyűjtésére 30 percen át szobahőmérsékleten centrifugálunk, 12.000 g-vel. A felüluszt kiöntjük, és a dezoxi-ribonukleinsav üledéket 70 %-os, vizes etanollal mossuk, szobahőmérsékleten. Az etanolos mosófolyadékot kiöntjük, és a csapadékot csökkentett nyomásu térben szárítjuk. A száraz anyagot 8 ml alábbi összetételű TE pufferban szuszpendáljuk:



trisz-hidroklorid, pH = 8,0                                      10 mmól

EDTA                                                                                      1 mmól.

A dezoxi-ribonukleinsav-oldathoz 8 g cézium-kloridot adunk. 10 - 10 ml cézium-klorid dezoxi-ribonukleinsav-oldat mindegyikéhez 10 mg/ml-es oldatból 0,8 ml vizes etidium-bromid-oldatot adagolunk. Az oldat végsűrűsége cézium-kloridra számítva 1,55 g/ml, az etidium-bromid végkoncentrációja pedig 600 µg/ml. Az oldatot Beckman Type 50 centrifugacsőbe öntjük, a cső tetejére paraffinolajat cseppentünk, a csövet leforrasztjuk, majd ezután 24 órán át 20°C hőmérsékleten centrifugálunk, 45.000 percenkénti fordulatszámmal. A centrifugálást követően közönséges fényben két dezoxi-ribonukleinsav csíkot látunk a csőben. A centrifugacső tetejének levágása után az alább elhelyezkedő dezoxi-ribonukleinsav csíkot injekcióstüvel eltávolítjuk úgy, hogy az injekcióstüt a centrifugacső oldalába szurjuk be.

Az etidium-bromid eltávolítására vízzel telített 1-butanollal többször extrahálunk. A cézium-kloridot TE pufferral szemben végzett dialízissel távolítjuk el. A dezoxi-ribonukleinsav kicsapására pufferozott fenollal, és ezután kloroformmal extrahálunk, majd a kicsapódott terméket 70 %-os, vizes etanollal mossuk, amiután megszáritjuk. Ily módon 1 mg pLPC-FLIN plazmid dezoxi-ribonukleinsavat kapunk, amit 4°C hőmérsékleten TE pufferban tárolunk, 1 µg/µl töménységben. A pLPC-FLIN plazmid restrikciós és funkcionális

térképét a mellékelt 5. ábrán mutatjuk be. A megfelelő, a megadott NRRL sorszámon letétbe helyezett törzsekből a fentihez hasonló módon előállítjuk a pLPC-FN, pLPC-SC, pLPC-LIN és pLPC-N plazmidokat is. Ezeknek a plazmidoknak a restriktációs helyeit és funkcionális térképét a mellékelt ábrákon adjuk meg.

## 2. példa

### A pGT-FLIN plazmid előállítása

A humán C protein zimogének nagy koncentrációban való előállítására a pLPC-N, pLPC-FN, pLPC-SC, pLPC-LIN és pLPC-FLIN plazmidokat közvetlenül eukarióta gazdasejtekbe (előnyösen 293 jelű sejtekbe) transzformálhatjuk. Még magasabb értékű expresszió és szekréció érhető el, abban az esetben, ha a mutáns zimogént kódoló gént olyan vektor dezoxi-ribonukleinsavba építjük be, amelyben a gén expresszióját a GBMT transzkripció egység irányítja.

A pGTC plazmid ilyen vektor, amelyben a vad típusu humán C protein zimogénjének génjét a GBMT transzkripció egység vezérli. A vektorból a vad típusu C proteint meghatározó gén könnyen kihasítható egy BclI restriktációs fragmenszen, és egy másik BclI restriktációs fragmenszen a tálmány szerinti bármely gén beépíthető a vektorba. A plazmid



dezoxi-ribonukleinsav BclI enzimmel történő emésztését az 5'-GATC-3' szekvenciában levő adenin metileződése gátolja. Ezért a pGTC plazmidot olyan E. coli sejtekből izoláljuk, amelyekben nincs meg az adenin metiláz enzim, azaz az ugynevezett dam gén által meghatározott fehérje, ami az 5'-GATC-3' szekvenciában levő adenint metilezi. Az E. coli K12 GM48 (NRRL B-15725) törzsben nincs meg a funkcionális dam metiláz, és így előnyösen használhatjuk a plazmid-származékok előállítására során kiindulási dezoxi-ribonukleinsavként használt pGTC plazmid izolálására.

Az E. coli K12 GM48 sejteket tenyésztjük, transzformációra kompetenssé tesszük, és a pGTC plazmidot az 1. példában megadottak szerint eljárva transzformáljuk a sejtekbe. A transzformált sejteket ampicillint tartalmazó L-agarra szélesztjük, az E. coli K12 GM48/pGTC transzformán-sok egyik telepét az 1. példában megadottak szerint eljárva felhasználjuk a pGTC plazmid dezoxi-ribonukleinsav előállítására. 1 mg pGTC plazmid dezoxi-ribonukleinsavat állítunk elő, és 1 ml TE pufferban szuszpendáljuk. Hasonlóképpen, BclI enzimmel való emésztést megengedő módon izoláljuk a pGT-h és pGT-d plazmidokat is. A pGT-d plazmid hordozza a GBMT transzkripciós egységet úgy, hogy a BclI helyen gént nem tartalmaz, így bármely gént könnyen beépíthetünk.



A pGT-d plazmid tartalmazza az egér dhfr génjét, ezért a metotrexát rezisztens fenotípus alapján bármely transzformánst szelektálhatunk és szaporíthatunk. A pGT-h plazmid tartalmazza a GBMT transzkripciós egységet, tartalmazza egy gén beépítésére előnyösen használható BclI helyet, és hordozza a higromicin rezisztenciát meghatározó gént is. Az E. coli K12 AG1 törzsek hordozzák a fenti plazmidokat, és 1990. január 18-án NRRL sorszámon letétbe helyeztük őket. A törzsek az alábbi letéti számmal rendelkeznek:

E. coli K12 AG1/pGT-d: NRRL B-18591,

E. coli K12 AG1/pGT-h: NRRL B-18592,

E. coli K12 AG1/pGTC: NRRL B-18593.

A plazmidok restrikciós és funkcionális térképét a mellékelt ábrákon adjuk meg.

Az 1. példában megadottak szerint előállított pLPC-FLIN plazmid dezoxi-ribonukleinsav 10  $\mu$ l-ét 20  $\mu$ l 10 x BclI restrikciós pufferban oldunk. a puffer összetétele a következő:

trisz-hidroklorid, pH = 7,4	100 mmól
kálium-klorid	1,5 mól
magnézium-diklorid	100 mmól
ditio-treitol	10 mmól.



Az oldathoz 20  $\mu$ l 1 mg/ml-es koncentrációjú borju szérum albumint és 5  $\mu$ l BclI restriktációs enzimet adunk (ez 50 egységnek felel meg, ahogy azt a Bethesda Research Laboratories /BRL/ megadja). A leírásban ismertetett kísérletek során minden esetben az ettől a cégtől vásárolt enzimeket használjuk. 145  $\mu$ l vízzel egészítjük ki a reakcióelegyet, majd ezután 2 órán át 37<sup>o</sup>C hőmérsékleten inkubáljuk. A leírásban ismertetett összes restriktációs enzimes reakciót fenollal állítjuk le, majd kloroformmal extraháljuk a reakcióelegyet, amiután kicsapjuk a dezoxi-ribonukleinsavat, etanollal mossuk, és TE pufferban szuszpendáljuk az így kapott dezoxi-ribonukleinsavat. Az emésztett dezoxi-ribonukleinsavat ezután 1 % agarózt tartalmazó gélen elektroforézissel vizsgáljuk. Esetünkben a mutáns gént tartalmazó, 1400 bázispárból álló restriktációs fragmenst BioRad Prep-A-Gene Kit-et használva tisztítjuk, a tisztítást az előállító utasításai szerint végezve.

Ezután az 1. példában megadott módon, az E. coli K12 AG1/pGTC (NRRL B-18593 letéti számu) törzsből izoláljuk a pGTC plazmidot, amit a 2. példában megadottak szerint GM48 sejtekből állítottunk elő. Ezután a fentiek szerint eljárva BclI restriktációs enzimmel emésztjük a pGTC plazmid dezoxi-ribonukleinsavat, a nagyobb vektor fragmenst izoláljuk, és tisztítjuk. A vektor fragmenst 90  $\mu$ l térfogatu, 8,0 pH-ju TE pufferban vesszük fel, ezután 10  $\mu$ l



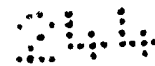


(0,05 egység) alkalikus foszfatázt adagolunk a vektor dezoxi-ribonukleinsav végeinek defoszforilezésére. A reakcióelegyet 30 percen át  $37^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten inkubáljuk, majd 10  $\mu\text{l}$  500 mmólos EGTA oldatot adagolunk, és 45 percen át  $65^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten inkubáljuk az elegyet, az enzim inaktiválására. Ezt követően fenollal és kloroformmal extraháljuk a reakcióelegyet, etanollal kicsapjuk a dezoxi-ribonukleinsavat, amit mosunk, és 20  $\mu\text{l}$  vízben szuszpendálunk.

7  $\mu\text{l}$  (10 ng) BclI enzimmel emésztett vektor fragmenst keverünk 1  $\mu\text{l}$  (100 ng) 1400 bázispárból álló, a pLPC-FLIN plazmidból származó BclI restrikciós fragmenssel, 1  $\mu\text{l}$  10 X ligáz pufferral és 1  $\mu\text{l}$  T4 dezoxi-ribonukleinsav ligázzal. A ligáz puffer összetétele a következő:

trisz-hidroklorid, pH = 7,6	0,5 mól
magnézium-diklorid	100 mmól
ditio-treitol	100 mmól
borju szérum albumin	500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

A reakcióelegyet 12 - 16 órán át  $16^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten inkubáljuk. A reakció után olyan plazmidokat kapunk, amelyek a mutáns zimogén gént a GBMT transzkripciós egységhez képest megfelelő orientációban helyezkedik el; de kapunk olyan plazmidokat is, ahol a gén fordított irányu. A gént megfelelő transzkripciós orientációban tartalmazó plazmidokat pGT-FLIN jellel jelöljük.



Fagyasztott, kompetens *E. coli* K12 AG1 sejteket a Strategene cégtől szerzünk be (3770 Tansey Road, San Diego, California 92121). 5  $\mu$ l ligációs reakcióelegyet 100  $\mu$ l kompetens sejtszuszpenzióval elegyítünk, majd 1 órán át jégfürdőben inkubáljuk a sejtek és a dezoxi-ribonukleinsav elegyét. Ezután 45 másodpercen át 42°C hőmérsékleten kezeljük a szuszpenziót, majd 2 percre ismét jégfürdőbe helyezzük. A sejt-dezoxi-ribonukleinsav elegyet ezután 1,0 ml LB táptalajjal hígítjuk egy Falcon 2059 csőben, és 1 órán át 37°C hőmérsékleten inkubáljuk a tenyészetet. 100  $\mu$ l térfogatú alikvotokat ampicillint tartalmazó LB-agar táptalajra szélesztünk, és 37°C hőmérsékleten addig tenyésztünk, míg a lemezekén telepek jelennek meg.

Az egyes telepeket külön-külön tenyésztjük, és az egyes telepekből származó plazmid dezoxi-ribonukleinsavakat restrikciós enzimes analízissel vizsgáljuk. A plazmid dezoxi-ribonukleinsav izolálását kis térfogatban végezzük, az 1. példában megadottak szerint eljárva, azzal a különbséggel, hogy a cézium-kloridos lépést kihagyjuk mindaddig, míg a megfelelő *E. coli* K12 AG1/pGT-FLIN transzformánsokat azonosítjuk. Ekkor nagyléptékű, gondosan tisztított plazmid izolálást végzünk. Az 1. és a 2. példában megadottak szerint eljárva, bármely mutáns zimogén gént könnyen klónozzhatunk bármely GBMT szekvenciát hordozó vektorba.



### 3. példa

Az adenovirussal transzformált humán 293 jelű embrió vese-  
sejtvonal és az adenovirussal transzformált szíriai hörcsög  
AV12 sejtvonal pGT-FLIN plazmid transzformánsainak előállí-  
tása

Humán embrió 293 jelű vesesejtvonalat az American Type Culture Collection törzsgyűjteményéből szerezhetünk be ATCC CRL 1573 letéti szám alatt. Az adenovirussal transzformált szíriai AV12 hörcsög sejtvonal szintén beszerezhető innen ATCC CRL 9595 sorszámon. Az alábbiakban megadott transzformációs eljárást a 293 jelű sejtvonalra adjuk meg, azonban az eljárás általános érvényű a legtöbb eukarióta sejtvonalra, ideértve az AV12 sejteket is, érvényes továbbá a találmány szerinti összes expressziós vektorra.

A 293 jelű sejtvonalat az ATCC törzsgyűjteményéből kaptuk (CRL 1573), 25 mm<sup>2</sup> nagyságú tenyésztőedényben, amely egy átlátszatlan rétegben tartalmazott  $5,5 \times 10^6$  sejtet Eagle minimál táptalajon (Gibco) 10 % hőinaktivált lószérummal. A tenyésztőedényt 37°C hőmérsékleten tartjuk, és a táptalajt hetente kétszer cseréljük. A táptalaj DMEM (Gibco) komponensből áll 10 % borju szérummal, 50 µg/ml gentamicinnel és 10 µg/ml AquaMEPHYTON<sup>®</sup> fitonadion K<sub>1</sub> vitaminnal kiegészítve (Merck Sharp és Dohme, Merck and Co., Inc., West Point, PA 19486). A sejteket a táptalaj eltávolításával,



Hank sóoldatával (Gibco) mosva tenyésztjük, 1 - 2 percre 0,25 %, 0,2 g/l etilén-diamin-tetraecetsavat tartalmazó tripszinnel kezeljük. A sejteket friss táptalajjal mossuk, levegőztetjük, és 1 : 5 vagy 1 : 10 arányban átoltva, új tenészedényekre juttatjuk.

A transzformáció előtt egy nappal a sejtekből  $0,7 \times 10^6$  darabot 100 mm-es tenyésztőedénybe juttatunk. Vizben oldott steril, etanollal kicsapott plazmid dezoxi-ribonukleinsavat használunk a 2X dezoxi-ribonukleinsav-kalcium-diklorid-oldat elkészítésére, amely 25  $\mu\text{g/ml}$  transzformálandó plazmid dezoxi-ribonukleinsavat és 250 mmól kalcium-dikloridot tartalmaz. 2X HBSS oldatot állítunk elő úgy, hogy 280 mmól nátrium-kloridot, 50 mmól Hepes-t és 1,5 mmól nátrium-foszfátot oldunk, az oldat pH-ját 7,05 - 7,15-re állítjuk be. A 2X dezoxi-ribonukleinsav-kalcium-diklorid-oldatot azonos térfogatu steril, 2X HBSS elegyhez adjuk cseppenként. 1 ml-es műanyag, steril pipettát (gyapot dugóval elzárva) merítünk a 2X HBSS elegyet tartalmazó csőbe, majd buborékoltatjuk az elegyet a dezoxi-ribonukleinsav adagolása közben. A kalcium-foszfát-dezoxi-ribonukleinsav csapadékot keverés nélkül hagyjuk kialakulni, szobahőmérsékleten, 30 - 45 percen át.

A csapadékot műanyag pipettával pipettázva enyhén kevergetjük, és egy lemezre 1 ml csapadékot adunk, közvetlenül a recipiens sejteket fedő 10 ml tápoldathoz.



37°C hőmérsékleten 4 órán át inkubálunk, majd friss tápoldattal cseréljük ki a régit, és a sejteket további 72 órán át inkubáljuk, a szelektív nyomás biztosítása előtt. Az eukarióta sejtekben működő, szelektálható markert nem tartalmazó plazmidok esetén, mint például a pGT-FLIN plazmidnál, a transzformáció során plazmid-keveréket használunk: használunk egy szelektálható markert nem tartalmazó, jelen találmány szerinti expressziós vektort és egy olyan expressziós vektor dezoxi-ribonukleinsavat, amely eukarióta sejtekben funkcionáló szelektálható markert hordoz. Ilyen együttes transzformációs rendszerekben használható vektorok jól ismertek, ilyen például a pSV2-dhfr plazmid (ATCC 37146), a pSV2-neo plazmid (ATCC 37149), a pSV2-gpt (ATCC 37145) és a pSV2-hyg plazmid (NRRL B-18039). A pSV2-hyg plazmid eukarióta sejtekben kifejeződő higromicin B rezisztenciát hordoz. Ez a kotranszformációs technika lehetővé teszi azoknak a sejteknek a szelekcióját, amely a szelektálható markert hordozó plazmidot tartalmazzák. Az így kiválasztott sejteket tovább vizsgáljuk azoknak a sejteknek a kiválasztására, amely mindkét transzformálandó plazmidot hordozza. A találmány oltalmi köréhez tartoznak természetesen azok az expressziós vektorok is, amelyek eukarióta sejtekben működő szelektálható markert tartalmaznak, és ezért nem igénylik a kotranszformációs technikát.



Abban az esetben, ha higromicin rezisztenciát meghatározó gént hordozó plazmiddal transzformálunk, mint például a pGT-FLIN-h plazmidnál, a tápoldatba 200  $\mu\text{g/ml}$  végkoncentrációban higromicin B antibiotikumot adagolunk. A sejteket ezután 2 - 4 héten át  $37^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten inkubáljuk, a tápoldatot 3 - 4 naponként cseréljük. A kapott, higromicinre rezisztens kolóniákat egyenként tenyésztőedényekbe juttatjuk, jellemzés céljából.

A pSV2-neo plazmid neomicinre (a neomicin helyett használható G418 antibiotikumra is) rezisztenciát biztosító gént hordoz, a G418 antibiotikumokkal szemben rezisztens kolóniák szelektálását a higromicin rezisztens sejtek kiválasztása kapcsán fentiekben megadott eljárás alapján végezzük, azzal a különbséggel, hogy G418 antibiotikumot adagolunk  $400 \mu\text{g/ml}$  végkoncentrációban.

A dihidrofolát reduktáz (dhfr) gén vagy a dhfr gén metotrexát rezisztenciát meghatározó származéka (dhfr-mtx) szelektálható marker akkor, ha dhfr-hiányos sejtvonalakba juttatjuk a gént vagy a gént hordozó plazmidot, és ezután metotrexátot használunk a plazmid példányszámának növelésére. Ez az eljárás az irodalomban részletesen le van írva. A 293 jelű sejtvonala dhfr-pozitív, így a dhfr gént hordozó plazmidokkal transzformált sejtek dhfr-pozitív fenotípusra, azaz hipoxantin és timin hiányban



való növekedésképessegre nem szelektálhatók. Azokat a sejtvonalakat, amelyek funkcionális dhfr gént nem tartalmaznak, és amelyeket dhfr gént tartalmazó plazmidokkal transzformáltunk, dhfr-pozitív fenotípusra szelektálhatunk. Bár a dhfr karakter használata szelekcióra és plazmid-szorosításra nem teljesen ismert, az irodalomból nyert bizonyítékok azt sugallják, hogy a dhfr karakter dhfr termelő sejtekben használható szelektálható markerként és génamplifikációra. A találmány szerinti eljárást nem limitáljuk az expressziós vektorokban használt, szelektálható markerekre. A fentiekén kívül az alábbi markerek használhatóak még: metallo-tionein gének, adenozin dezamináz gének vagy többszörös rezisztenciát biztosító dezoxi-ribonukleinsav szakaszok, például a P-glikoprotein gén.

A 293 jelű és az AV12 sejtvonal pGT-FLIN plazmiddal és higromicin rezisztenciát hordozó gént tartalmazó vektorral történő együttes transzformációja és a transzformációt követő higromicin rezisztencia alapján kivitelezett szelekciót követően sok transzformánst kapunk. (Más transzformánsokat kapunk akkor, ha a pSV2-neo plazmidot használjuk, és G418 antibiotikumra való rezisztenciára szelektálunk.)



Az ebben a példában leírt eljárás a találmány szerinti összes humán C protein zimogén terméket meghatározó plazmiddal használható.

#### 4. példa

#### Humán C protein zimogén mutánsokat szekretáló sejtek szelektálása

A 3. példában megadottak szerint kapott higromicin rezisztens transzformánsokat 100 mm<sup>2</sup> nagyságu szövettenyésztő edényben növesztjük addig, míg a sejtek sűrűsége tenyésztőedényenként eléri a többszáz sejtklónt. Dekantáljuk a tápfolyadékot, és a sejteket kétszer 5 ml Hank sóoldattal (Gibco) mossuk. Ezután 0,45 % agart (Sigma Type 4 agaróz, katalógusszám: A3643, Sigma Chemical Co., P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178) steril oldatot készítünk úgy, hogy 1 ml 1,8 % agart tartalmazó 47°C hőmérsékletű oldatot keverünk 3 ml Dulbecco módosított Eagle (DME) sóoldattal (Gibco), amelynek a hőmérsékletét 37°C-ra állítottuk be. 2 ml ilyen, 0,45 % agart tartalmazó oldattal rétegezzük a sejttenyészetet.

Nitrocellulóz szűrőket (Schleicher és Schueel, Inc., Keene, NH 03431) forralunk vízben, és ezután 2 órán át autoklávozzuk a nedvesítőszer eltávolítására, amely a sejtekre



nézve toxikus. Ezután az agarréteg tetejére helyezzük a szűrőket, és a levegőbuborékok eltávolítása után a lemezeket 1 - 3 órán át inkubáljuk 37°C hőmérsékleten. A szűrőket előzőleg bejelöljük úgy, hogy a tenyészetben való elhelyezkedést utólag felismerhessük, ily módon a telepeket azonosíthatjuk. Az inkubáció után leemeljük a szűrőket, és az alábbi összetételű PBS elegybe helyezzük:

trisz-hidroklorid, pH = 7,2	50 mmól
nátrium-klorid	150 mmól.

A szűrők analizise alatt életben tartjuk a lemezeken levő sejteket, ezt úgy érjük el, hogy a tenyészetet 8 ml alábbi összetételű eleggyel rétegezzük felül:

2 ml, 1,8 %-os, 47°C-os agar-oldat,  
 2 ml DME só-elegy (37°C hőmérsékletű), és  
 4 ml, 20 % borju szérumot tartalmazó, 37°C hőmérsékletű DME só-oldat.

A tenyészetet ezután 37°C hőmérsékletű inkubátorba helyezzük.

A szűrők mosását és a velük végzett kísérleteket rázóasztalon végezzük. A szűrőket először 5 % tejet tartalmazó PBS elegyben blokkoljuk úgy, hogy szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ezután 5 percenként öblítve négyszer PBS oldattal öblítjük azokat. Ezután 10 µg/ml biotinilezett kecske anti-humán C protein poliklónozott antitestet adagolunk a szűrőkre 2,5 %-os borju szérum albumin oldatban



(a mennyiséget úgy választjuk meg, hogy az elegy elfedje a szűrőt), amiután 1 órán át  $37^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten inkubálunk.

A C proteinnel szembeni antitestek előállításához szükséges C protein tisztítását Kisiel szerint végezzük /J. Clin. Invest., 64, 761 (1979)/. A poliklónozott antitesteket Kabat szerint állíthatjuk elő /Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry, Holt, Rhinehart és Winston kiadása, 1968/. A monoklónozott antitesteket, ezeket mérésre is felhasználhatjuk, Kohler és Milstein szerint állíthatjuk elő /Nature, 256, 495. (1975); 4,696,895 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; 205046 számú európai szabadalmi leírás; Laurel és munkatársai, FEBS, 191(1), 75. (1985); Suzuki és munkatársai, J. Biochem., 97, 127 - 138. (1985); 138222 számú európai szabadalmi leírás/. A méréshez használt avidin D-t és a biotinilezett lóreték peroxidázt (HRP) Vectastain<sup>TM</sup> kitből szerezzük be (Vector Laboratories, Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010). A biotint is a Vector Laboratories-től vásároltuk.

A szűrőket négyszer PBS eleggyel öblítjük  $4^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten. Ezután előállítjuk az avidin D-t és a biotinilezett reték peroxidáz reakcióelegyet, és hozzáadjuk a szűrőkhöz az előállító instrukciói szerint



(Vectastain<sup>TM</sup>; Vector Laboratories). A szűrőket a HRP-hez kötött avidin D-vel együtt inkubáljuk 4<sup>o</sup>C hőmérsékleten, 1 órán át (hosszabb inkubációs időt, például egy éjszakán át tartó reakcióidőt is használhatunk akkor, ha kevés protein szekretálódott). A reakció lezajlása után a szűrőket négyszer PBS eleggyel mossuk 4<sup>o</sup>C hőmérsékleten, négy alkalommal.

Az indikátor szín szűrőn történő előhívásához 30 mg HRP szinelőhívó reagenst (4-klór-1-naftol, Sigma) oldunk jéghideg, 100 %-os metanolban, majd az oldatot hozzáadjuk 50 ml PBS és 30  $\mu$ l 30 %-os hidrogén-peroxid elegyéhez. Ezt az elegyet hozzáadjuk a nitrocellulóz szűrőkhöz, majd addig inkubáljuk azokat szobahőmérsékleten, míg a szín megjelenik. A találmány szerinti legtöbb humán C proteint szekretáló kolóniák nemcsak arról ismerhetők fel, hogy a szűrőkön az elszíneződésük korán jelentkezik, hanem arról is, hogy a kolóniák színe sötétebb.

A szűrők előhívása után megállapítjuk, hogy az eredeti tenyésztőedényekben mely kolóniák azok, amelyek a szűrőn foltot adtak. A legtöbb, találmány szerinti humán C protein zimogént szekretáló kolóniát kiválasztjuk, és felhasználjuk a zimogén termelésére.



A témában jártas szakemberek tudják, hogy a fenti mérés csak szemlélteti az erősen szekretáló sejtvo-  
nalak azonosítását. A fentén kívül számtalan módszer hasz-  
nálható sikeresen, így például olyan kettős antitest reak-  
ciót is használhatunk, amelynek során a biotinilezett  
kecske anti C protein antitestet helyettesítjük egy kecske  
C anti-protein antitesttel (IgG), és biotinilezett anti  
kecske IgG antitesttel.

A zimogén mutánsokat tisztíthatjuk a sejtte-  
nyészetből. A rekombináns terméket expresszáló sejtekről  
eltávolítjuk a felüluszt, és Pharmacia Fastflow-Q oszlo-  
pon tisztítjuk. Ugy járunk el, hogy 1 ml gyantát 20 mmól  
trisz-hidroklorid (pH = 7,4), 0,15 mól nátrium-klorid,  
5 mmól etilén-diamin-tetraecetsav és 4 mmól benzamidin  
elegyével egyensúlyozunk ki. A tenyészet felülusztójának  
pH-ját 7,4-re állítjuk be 8,0 pH-ju trisz-hidroklorid-ol-  
dat adagolásával, majd 5 mmól etilén-diamin-tetraecetsa-  
vat és 4 mmól benzamidint adagolunk. A felülusztót ezután  
ráöntjük a gyanta tetejére, és 3 oszlop-térfogatnyi  
trisz-hidroklorid (pH = 7,4) és 0,15 mól nátrium-klorid  
elegyével mossuk. A rekombináns terméket az alábbi össze-  
tételű eluciós pufferral eluáljuk az oszlopról:

10 mmól kalcium-diklorid,

150 mmól nátrium-klorid és

20 mmól trisz-hidroklorid (pH = 7,4).



A termék specifikus aktivitását Grinnell és munkatársai szerint határozzuk meg /Biotechnology, 5, 1189 - 1192. (1987)/, az alábbiak szerint: az oszlopról eluálódó koncentrált terméket először immobilizált trombin-trombomodulin komplexszel aktiváljuk. A termék amidolitikus aktivitását az S-2366 (Helena Labs) tripeptid szubsztrát hidrolizálásával mérjük. A termék antikoaguláns aktivitását a Helena Labs-tól beszerzett reagenssel határozzuk meg úgy, hogy mérjük az aktivált részleges trombo-plasztin idő meghosszabbodását.



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás egy rekombináns dezoxi-ribonukleinsav vektor előállítására, azzal j e l l e m e z v e ,  
hogyan összekapcsolunk

- I) egy rekombináns dezoxi-ribonukleinsav klónozó vektort, és
- II) egy olyan dezoxi-ribonukleinsav szekvenciát, amely az aminoterminális végtől a karboxilterminális végig az alábbi részekből álló proteint kódol:
  - a/ egy szignálpeptid és egy gamma-karboxilezett propeptid, szekretált protein;
  - b/ a humán C protein könnyülánca;
  - c/ az alábbi dipeptidek egyikét: lizin-arginin, arginin-lizin, lizin-lizin és arginin-arginin; továbbá
  - d/ az alábbi aminosav szekvencia:



ASP THR GLU R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> R<sub>4</sub> R<sub>5</sub> R<sub>6</sub>  
R<sub>7</sub> R<sub>8</sub> R<sub>9</sub> R<sub>10</sub> R<sub>11</sub> R<sub>12</sub> GLY LYS MET THR ARG ARG GLY ASP SER PRO  
TRP GLN VAL VAL LEU LEU ASP SER LYS LYS LYS LEU ALA CYS GLY ALA  
VAL LEU ILE HIS PRO SER TRP VAL LEU THR ALA ALA HIS CYS MET ASP  
GLU SER LYS LYS LEU LEU VAL ARG LEU GLY GLU TYR ASP LEU ARG ARG  
TRP GLU LYS TRP GLU LEU ASP LEU ASP ILE LYS GLU VAL PHE VAL HIS  
PRO ASN TYR SER LYS SER THR THR ASP ASN ASP ILE ALA LEU LEU HIS  
LEU ALA GLN PRO ALA THR LEU SER GLN THR ILE VAL PRO ILE CYS LEU  
PRO ASP SER GLY LEU ALA GLU ARG GLU LEU ASN GLN ALA GLY GLN GLU  
THR LEU VAL THR GLY TRP GLY TYR HIS SER SER ARG GLU LYS GLU ALA  
LYS ARG ASN ARG THR PHE VAL LEU ASN PHE ILE LYS ILE PRO VAL VAL  
  
PRO HIS ASN GLU CYS SER GLU VAL MET SER ASN MET VAL SER GLU ASN  
MET LEU CYS ALA GLY ILE LEU GLY ASP ARG GLN ASP ALA CYS GLU GLY  
ASP SER GLY GLY PRO MET VAL ALA SER PHE HIS GLY THR TRP PHE LEU  
VAL GLY LEU VAL SER TRP GLY GLU GLY CYS GLY LEU LEU HIS ASN TYR  
GLY VAL TYR THR LYS VAL SER ARG TYR LEU ASP TRP ILE HIS GLY HIS  
ILE ARG ASP LYS GLU ALA PRO GLN LYS SER TRP ALA PRO-COOH,



ahol

R <sub>1</sub>	ASP vagy LEU,
R <sub>2</sub>	GLN vagy HIS,
R <sub>3</sub>	GLU vagy LYS,
R <sub>4</sub>	ASP vagy LEU,
R <sub>5</sub>	GLN,
R <sub>6</sub>	VAL vagy THR,
R <sub>7</sub>	ASP, PHE vagy TYR,
R <sub>8</sub>	PRO,
R <sub>9</sub>	ARG,
R <sub>10</sub>	LEU vagy THR,
R <sub>11</sub>	ILE vagy egy deléció,
R <sub>12</sub>	ASN, és ahol
-COOH	a karboxilterminális vég.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az adott dezoxi-ribonukleinsav az alábbi polipeptidet kódolja:

H<sub>2</sub>N-MET TRP GLN LEU THR SER LEU LEU LEU PHE VAL ALA THR TRP GLY ILE  
SER GLY THR PRO ALA PRO LEU ASP SER VAL PHE SER SER SER GLU ARG  
ALA HIS GLN VAL LEU ARG ILE ARG LYS ARG ALA ASN SER PHE LEU GLU  
GLU LEU ARG HIS SER SER LEU GLU ARG GLU CYS ILE GLU GLU ILE CYS  
ASP PHE GLU GLU ALA LYS GLU ILE PHE GLN ASN VAL ASP ASP THR LEU  
ALA PHE TRP SER LYS HIS VAL ASP GLY ASP GLN CYS LEU VAL LEU PRO  
LEU GLU HIS PRO CYS ALA SER LEU CYS CYS GLY HIS GLY THR CYS ILE





ASP GLY ILE GLY SER PHE SER CYS ASP CYS ARG SER GLY TRP GLU GLY  
ARG PHE CYS GLN ARG GLU VAL SER PHE LEU ASN CYS SER LEU ASP ASN  
GLY GLY CYS THR HIS TYR CYS LEU GLU GLU VAL GLY TRP ARG ARG CYS  
SER CYS ALA PRO GLY TYR LYS LEU GLY ASP ASP LEU LEU GLN CYS HIS  
PRO ALA VAL LYS PHE PRO CYS GLY ARG PRO TRP LYS ARG MET GLU LYS  
LYS ARG SER HIS LEU LYS ARG ASP THR GLU R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> R<sub>4</sub> R<sub>5</sub> R<sub>6</sub>  
R<sub>7</sub> R<sub>8</sub> R<sub>9</sub> R<sub>10</sub> R<sub>11</sub> R<sub>12</sub> GLY LYS MET THR ARG ARG GLY ASP SER PRO  
TRP GLN VAL VAL LEU LEU ASP SER LYS LYS LYS LEU ALA CYS GLY ALA  
VAL LEU ILE HIS PRO SER TRP VAL LEU THR ALA ALA HIS CYS MET ASP  
GLU SER LYS LYS LEU LEU VAL ARG LEU GLY GLU TYR ASP LEU ARG ARG  
TRP GLU LYS TRP GLU LEU ASP LEU ASP ILE LYS GLU VAL PHE VAL HIS  
PRO ASN TYR SER LYS SER THR THR ASP ASN ASP ILE ALA LEU LEU HIS  
LEU ALA GLN PRO ALA THR LEU SER GLN THR ILE VAL PRO ILE CYS LEU  
PRO ASP SER GLY LEU ALA GLU ARG GLU LEU ASN GLN ALA GLY GLN GLU  
THR LEU VAL THR GLY TRP GLY TYR HIS SER SER ARG GLU LYS GLU ALA  
LYS ARG ASN ARG THR PHE VAL LEU ASN PHE ILE LYS ILE PRO VAL VAL  
PRO HIS ASN GLU CYS SER GLU VAL MET SER ASN MET VAL SER GLU ASN  
MET LEU CYS ALA GLY ILE LEU GLY ASP ARG GLN ASP ALA CYS GLU GLY  
ASP SER GLY GLY PRO MET VAL ALA SER PHE HIS GLY THR TRP PHE LEU  
VAL GLY LEU VAL SER TRP GLY GLU GLY CYS GLY LEU LEU HIS ASN TYR  
GLY VAL TYR THR LYS VAL SER ARG TYR LEU ASP TRP ILE HIS GLY HIS  
ILE ARG ASP LYS GLU ALA PRO GLN LYS SER TRP ALA PRO-COOH,



ahol

R <sub>1</sub>	ASP,
R <sub>2</sub>	GLN,
R <sub>3</sub>	GLU,
R <sub>4</sub>	ASP,
R <sub>5</sub>	GLN,
R <sub>6</sub>	VAL,
R <sub>7</sub>	ASP,
R <sub>8</sub>	PRO,
R <sub>9</sub>	ARG,
R <sub>10</sub>	LEU,
R <sub>11</sub>	egy deléció, és ahol
R <sub>12</sub>	ASN.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a pLPC-N vagy pGT-N plazmidok egyikét használjuk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az adott dezoxi-ribonukleinsav az alábbi polipeptidet kódolja:



H<sub>2</sub>N-MET TRP GLN LEU THR SER LEU LEU LEU PHE VAL ALA THR TRP GLY ILE  
SER GLY THR PRO ALA PRO LEU ASP SER VAL PHE SER SER SER GLU ARG  
ALA HIS GLN VAL LEU ARG ILE ARG LYS ARG ALA ASN SER PHE LEU GLU  
GLU LEU ARG HIS SER SER LEU GLU ARG GLU CYS ILE GLU GLU ILE CYS  
ASP PHE GLU GLU ALA LYS GLU ILE PHE GLN ASN VAL ASP ASP THR LEU  
ALA PHE TRP SER LYS HIS VAL ASP GLY ASP GLN CYS LEU VAL LEU PRO  
LEU GLU HIS PRO CYS ALA SER LEU CYS CYS GLY HIS GLY THR CYS ILE  
ASP GLY ILE GLY SER PHE SER CYS ASP CYS ARG SER GLY TRP GLU GLY  
ARG PHE CYS GLN ARG GLU VAL SER PHE LEU ASN CYS SER LEU ASP ASN  
GLY GLY CYS THR HIS TYR CYS LEU GLU GLU VAL GLY TRP ARG ARG CYS  
SER CYS ALA PRO GLY TYR LYS LEU GLY ASP ASP LEU LEU GLN CYS HIS  
PRO ALA VAL LYS PHE PRO CYS GLY ARG PRO TRP LYS ARG MET GLU LYS  
LYS ARG SER HIS LEU LYS ARG ASP THR GLU R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> R<sub>4</sub> R<sub>5</sub> R<sub>6</sub>  
R<sub>7</sub> R<sub>8</sub> R<sub>9</sub> R<sub>10</sub> R<sub>11</sub> R<sub>12</sub> GLY LYS MET THR ARG ARG GLY ASP SER PRO  
TRP GLN VAL VAL LEU LEU ASP SER LYS LYS LYS LEU ALA CYS GLY ALA  
VAL LEU ILE HIS PRO SER TRP VAL LEU THR ALA ALA HIS CYS MET ASP  
GLU SER LYS LYS LEU LEU VAL ARG LEU GLY GLU TYR ASP LEU ARG ARG  
TRP GLU LYS TRP GLU LEU ASP LEU ASP ILE LYS GLU VAL PHE VAL HIS  
PRO ASN TYR SER LYS SER THR THR ASP ASN ASP ILE ALA LEU LEU HIS  
LEU ALA GLN PRO ALA THR LEU SER GLN THR ILE VAL PRO ILE CYS LEU  
PRO ASP SER GLY LEU ALA GLU ARG GLU LEU ASN GLN ALA GLY GLN GLU  
THR LEU VAL THR GLY TRP GLY TYR HIS SER SER ARG GLU LYS GLU ALA  
LYS ARG ASN ARG THR PHE VAL LEU ASN PHE ILE LYS ILE PRO VAL VAL  
PRO HIS ASN GLU CYS SER GLU VAL MET SER ASN MET VAL SER GLU ASN  
MET LEU CYS ALA GLY ILE LEU GLY ASP ARG GLN ASP ALA CYS GLU GLY  
ASP SER GLY GLY PRO MET VAL ALA SER PHE HIS GLY THR TRP PHE LEU  
VAL GLY LEU VAL SER TRP GLY GLU GLY CYS GLY LEU LEU HIS ASN TYR  
GLY VAL TYR THR LYS VAL SER ARG TYR LEU ASP TRP ILE HIS GLY HIS  
ILE ARG ASP LYS GLU ALA PRO GLN LYS SER TRP ALA PRO-COOH,



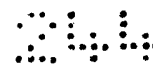
ahol

R <sub>1</sub>	ASP,
R <sub>2</sub>	GLN,
R <sub>3</sub>	GLU,
R <sub>4</sub>	ASP,
R <sub>5</sub>	GLN,
R <sub>6</sub>	VAL,
R <sub>7</sub>	PHE,
R <sub>8</sub>	PRO,
R <sub>9</sub>	ARG,
R <sub>10</sub>	LEU,
R <sub>11</sub>	egy deléció, és ahol
R <sub>12</sub>	ASN.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a pLPC-FN plazmidot használjuk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az adott dezoxi-ribonukleinsav az alábbi polipeptidet kódolja:

H<sub>2</sub>N-MET TRP GLN LEU THR SER LEU LEU LEU PHE VAL ALA THR TRP GLY ILE  
SER GLY THR PRO ALA PRO LEU ASP SER VAL PHE SER SER SER GLU ARG  
ALA HIS GLN VAL LEU ARG ILE ARG LYS ARG ALA ASN SER PHE LEU GLU  
GLU LEU ARG HIS SER SER LEU GLU ARG GLU CYS ILE GLU GLU ILE CYS



ASP PHE GLU GLU ALA LYS GLU ILE PHE GLN ASN VAL ASP ASP THR LEU  
ALA PHE TRP SER LYS HIS VAL ASP GLY ASP GLN CYS LEU VAL LEU PRO  
LEU GLU HIS PRO CYS ALA SER LEU CYS CYS GLY HIS GLY THR CYS ILE  
ASP GLY ILE GLY SER PHE SER CYS ASP CYS ARG SER GLY TRP GLU GLY  
ARG PHE CYS GLN ARG GLU VAL SER PHE LEU ASN CYS SER LEU ASP ASN  
GLY GLY CYS THR HIS TYR CYS LEU GLU GLU VAL GLY TRP ARG ARG CYS  
SER CYS ALA PRO GLY TYR LYS LEU GLY ASP ASP LEU LEU GLN CYS HIS  
PRO ALA VAL LYS PHE PRO CYS GLY ARG PRO TRP LYS ARG MET GLU LYS  
LYS ARG SER HIS LEU LYS ARG ASP THR GLU R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> R<sub>4</sub> R<sub>5</sub> R<sub>6</sub>  
R<sub>7</sub> R<sub>8</sub> R<sub>9</sub> R<sub>10</sub> R<sub>11</sub> R<sub>12</sub> GLY LYS MET THR ARG ARG GLY ASP SER PRO  
TRP GLN VAL VAL LEU LEU ASP SER LYS LYS LYS LEU ALA CYS GLY ALA  
VAL LEU ILE HIS PRO SER TRP VAL LEU THR ALA ALA HIS CYS MET ASP  
GLU SER LYS LYS LEU LEU VAL ARG LEU GLY GLU TYR ASP LEU ARG ARG  
TRP GLU LYS TRP GLU LEU ASP LEU ASP ILE LYS GLU VAL PHE VAL HIS  
PRO ASN TYR SER LYS SER THR THR ASP ASN ASP ILE ALA LEU LEU HIS  
LEU ALA GLN PRO ALA THR LEU SER GLN THR ILE VAL PRO ILE CYS LEU  
PRO ASP SER GLY LEU ALA GLU ARG GLU LEU ASN GLN ALA GLY GLN GLU  
THR LEU VAL THR GLY TRP GLY TYR HIS SER SER ARG GLU LYS GLU ALA  
LYS ARG ASN ARG THR PHE VAL LEU ASN PHE ILE LYS ILE PRO VAL VAL  
PRO HIS ASN GLU CYS SER GLU VAL MET SER ASN MET VAL SER GLU ASN  
MET LEU CYS ALA GLY ILE LEU GLY ASP ARG GLN ASP ALA CYS GLU GLY  
ASP SER GLY GLY PRO MET VAL ALA SER PHE HIS GLY THR TRP PHE LEU  
VAL GLY LEU VAL SER TRP GLY GLU GLY CYS GLY LEU LEU HIS ASN TYR  
GLY VAL TYR THR LYS VAL SER ARG TYR LEU ASP TRP ILE HIS GLY HIS  
ILE ARG ASP LYS GLU ALA PRO GLN LYS SER TRP ALA PRO-COOH,



ahol

R <sub>1</sub>	ASP,
R <sub>2</sub>	GLN,
R <sub>3</sub>	GLU,
R <sub>4</sub>	ASP,
R <sub>5</sub>	GLN,
R <sub>6</sub>	VAL,
R <sub>7</sub>	PHE,
R <sub>8</sub>	PRO,
R <sub>9</sub>	ARG,
R <sub>10</sub>	LEU,
R <sub>11</sub>	egy deléció, és ahol
R <sub>12</sub>	ASN.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a pLPC-SC plazmidot használjuk.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az adott dezoxi-ribonukleinsav az alábbi polipeptidet kódolja:



H<sub>2</sub>N-MET TRP GLN LEU THR SER LEU LEU LEU PHE VAL ALA THR TRP GLY ILE  
SER GLY THR PRO ALA PRO LEU ASP SER VAL PHE SER SER SER GLU ARG  
ALA HIS GLN VAL LEU ARG ILE ARG LYS ARG ALA ASN SER PHE LEU GLU  
GLU LEU ARG HIS SER SER LEU GLU ARG GLU CYS ILE GLU GLU ILE CYS  
ASP PHE GLU GLU ALA LYS GLU ILE PHE GLN ASN VAL ASP ASP THR LEU  
ALA PHE TRP SER LYS HIS VAL ASP GLY ASP GLN CYS LEU VAL LEU PRO  
LEU GLU HIS PRO CYS ALA SER LEU CYS CYS GLY HIS GLY THR CYS ILE  
ASP GLY ILE GLY SER PHE SER CYS ASP CYS ARG SER GLY TRP GLU GLY  
ARG PHE CYS GLN ARG GLU VAL SER PHE LEU ASN CYS SER LEU ASP ASN  
GLY GLY CYS THR HIS TYR CYS LEU GLU GLU VAL GLY TRP ARG ARG CYS  
SER CYS ALA PRO GLY TYR LYS LEU GLY ASP ASP LEU LEU GLN CYS HIS  
PRO ALA VAL LYS PHE PRO CYS GLY ARG PRO TRP LYS ARG MET GLU LYS  
LYS ARG SER HIS LEU LYS ARG ASP THR GLU R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> R<sub>4</sub> R<sub>5</sub> R<sub>6</sub>  
R<sub>7</sub> R<sub>8</sub> R<sub>9</sub> R<sub>10</sub> R<sub>11</sub> R<sub>12</sub> GLY LYS MET THR ARG ARG GLY ASP SER PRO  
TRP GLN VAL VAL LEU LEU ASP SER LYS LYS LYS LEU ALA CYS GLY ALA  
VAL LEU ILE HIS PRO SER TRP VAL LEU THR ALA ALA HIS CYS MET ASP  
TRP GLU LYS TRP GLU LEU ASP LEU ASP ILE LYS GLU VAL PHE VAL HIS  
PRO ASN TYR SER LYS SER THR THR ASP ASN ASP ILE ALA LEU LEU HIS  
LEU ALA GLN PRO ALA THR LEU SER GLN THR ILE VAL PRO ILE CYS LEU  
PRO ASP SER GLY LEU ALA GLU ARG GLU LEU ASN GLN ALA GLY GLN GLU  
THR LEU VAL THR GLY TRP GLY TYR HIS SER SER ARG GLU LYS GLU ALA  
LYS ARG ASN ARG THR PHE VAL LEU ASN PHE ILE LYS ILE PRO VAL VAL  
PRO HIS ASN GLU CYS SER GLU VAL MET SER ASN MET VAL SER GLU ASN  
MET LEU CYS ALA GLY ILE LEU GLY ASP ARG GLN ASP ALA CYS GLU GLY  
ASP SER GLY GLY PRO MET VAL ALA SER PHE HIS GLY THR TRP PHE LEU  
VAL GLY LEU VAL SER TRP GLY GLU GLY CYS GLY LEU LEU HIS ASN TYR  
GLY VAL TYR THR LYS VAL SER ARG TYR LEU ASP TRP ILE HIS GLY HIS  
ILE ARG ASP LYS GLU ALA PRO GLN LYS SER TRP ALA PRO-COOH,



ahol

R <sub>1</sub>	ASP,
R <sub>2</sub>	GLN,
R <sub>3</sub>	GLU,
R <sub>4</sub>	ASP,
R <sub>5</sub>	GLN,
R <sub>6</sub>	VAL,
R <sub>7</sub>	ASP,
R <sub>8</sub>	PRO,
R <sub>9</sub>	ARG,
R <sub>10</sub>	LEU,
R <sub>11</sub>	ILE, és ahol
R <sub>12</sub>	ASN.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a pLPC-LIN plazmidot használjuk.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az adott dezox-ribonukleinsav az alábbi polipeptidet kódolja:

H<sub>2</sub>N-MET TRP GLN LEU THR SER LEU LEU LEU PHE VAL ALA THR TRP GLY ILE  
SER GLY THR PRO ALA PRO LEU ASP SER VAL PHE SER SER SER GLU ARG  
ALA HIS GLN VAL LEU ARG ILE ARG LYS ARG ALA ASN SER PHE LEU GLU  
GLU LEU ARG HIS SER SER LEU GLU ARG GLU CYS ILE GLU GLU ILE CYS  
ASP PHE GLU GLU ALA LYS GLU ILE PHE GLN ASN VAL ASP ASP THR LEU





ALA PHE TRP SER LYS HIS VAL ASP GLY ASP GLN CYS LEU VAL LEU PRO  
LEU GLU HIS PRO CYS ALA SER LEU CYS CYS GLY HIS GLY THR CYS ILE  
ASP GLY ILE GLY SER PHE SER CYS ASP CYS ARG SER GLY TRP GLU GLY  
ARG PHE CYS GLN ARG GLU VAL SER PHE LEU ASN CYS SER LEU ASP ASN  
GLY GLY CYS THR HIS TYR CYS LEU GLU GLU VAL GLY TRP ARG ARG CYS  
SER CYS ALA PRO GLY TYR LYS LEU GLY ASP ASP LEU LEU GLN CYS HIS  
PRO ALA VAL LYS PHE PRO CYS GLY ARG PRO TRP LYS ARG MET GLU LYS  
LYS ARG SER HIS LEU LYS ARG ASP THR GLU R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> R<sub>4</sub> R<sub>5</sub> R<sub>6</sub>  
R<sub>7</sub> R<sub>8</sub> R<sub>9</sub> R<sub>10</sub> R<sub>11</sub> R<sub>12</sub> GLY LYS MET THR ARG ARG GLY ASP SER PRO  
TRP GLN VAL VAL LEU LEU ASP SER LYS LYS LYS LEU ALA CYS GLY ALA  
VAL LEU ILE HIS PRO SER TRP VAL LEU THR ALA ALA HIS CYS MET ASP  
GLU SER LYS LYS LEU LEU VAL ARG LEU GLY GLU TYR ASP LEU ARG ARG  
TRP GLU LYS TRP GLU LEU ASP LEU ASP ILE LYS GLU VAL PHE VAL HIS  
PRO ASN TYR SER LYS SER THR THR ASP ASN ASP ILE ALA LEU LEU HIS  
LEU ALA GLN PRO ALA THR LEU SER GLN THR ILE VAL PRO ILE CYS LEU  
PRO ASP SER GLY LEU ALA GLU ARG GLU LEU ASN GLN ALA GLY GLN GLU  
THR LEU VAL THR GLY TRP GLY TYR HIS SER SER ARG GLU LYS GLU ALA  
LYS ARG ASN ARG THR PHE VAL LEU ASN PHE ILE LYS ILE PRO VAL VAL  
PRO HIS ASN GLU CYS SER GLU VAL MET SER ASN MET VAL SER GLU ASN  
MET LEU CYS ALA GLY ILE LEU GLY ASP ARG GLN ASP ALA CYS GLU GLY  
ASP SER GLY GLY PRO MET VAL ALA SER PHE HIS GLY THR TRP PHE LEU  
VAL GLY LEU VAL SER TRP GLY GLU GLY CYS GLY LEU LEU HIS ASN TYR  
GLY VAL TYR THR LYS VAL SER ARG TYR LEU ASP TRP ILE HIS GLY HIS  
ILE ARG ASP LYS GLU ALA PRO GLN LYS SER TRP ALA PRO-COOH,

ahol

R <sub>1</sub>	ASP,
R <sub>2</sub>	GLN,
R <sub>3</sub>	GLU,
R <sub>4</sub>	ASP,
R <sub>5</sub>	GLN,
R <sub>6</sub>	VAL,
R <sub>7</sub>	PHE,
R <sub>8</sub>	PRO,
R <sub>9</sub>	ARG,
R <sub>10</sub>	LEU,
R <sub>11</sub>	ILE, és ahol
R <sub>12</sub>	ASN.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a pLPC-FLIN plazmidot használjuk.

12. Eljárás a humán C protein zimogén alakjának rekombináns előállítására eukarióta gazdasejtéből történő szekréciónal, azzal jellemezve, hogy

A) egy eukarióta gazdasejtet az alábbi szekvenciákból álló rekombináns dezoxi-ribonukleinsav vektorral transzformálunk:

a/ egy aminosav szekvenciát meghatározó dezoxi-ribonukleinsav szekvencia, amely aminosav szekvencia az aminoterminális végtől a karboxilterminális végig áll:



- I/ egy szignálpeptid és egy gamma-karboxilezett propeptid, szekretált protein;
- II/ a humán C protein könnyű láncá;
- III/ az alábbi dipeptidek egyike: LYS-ARG, ARG-LYS, LYS-LYS vagy ARG-ARG; továbbá
- IV/ az alábbi aminosav szekvencia:

ASP THR GLU R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> R<sub>4</sub> R<sub>5</sub> R<sub>6</sub>  
R<sub>7</sub> R<sub>8</sub> R<sub>9</sub> R<sub>10</sub> R<sub>11</sub> R<sub>12</sub> GLY LYS MET THR ARG ARG GLY ASP SER PRO  
TRP GLN VAL VAL LEU LEU ASP SER LYS LYS LYS LEU ALA CYS GLY ALA  
VAL LEU ILE HIS PRO SER TRP VAL LEU THR ALA ALA HIS CYS MET ASP  
GLU SER LYS LYS LEU LEU VAL ARG LEU GLY GLU TYR ASP LEU ARG ARG  
TRP GLU LYS TRP GLU LEU ASP LEU ASP ILE LYS GLU VAL PHE VAL HIS  
PRO ASN TYR SER LYS SER THR THR ASP ASN ASP ILE ALA LEU LEU HIS  
LEU ALA GLN PRO ALA THR LEU SER GLN THR ILE VAL PRO ILE CYS LEU  
PRO ASP SER GLY LEU ALA GLU ARG GLU LEU ASN GLN ALA GLY GLN GLU  
THR LEU VAL THR GLY TRP GLY TYR HIS SER SER ARG GLU LYS GLU ALA  
LYS ARG ASN ARG THR PHE VAL LEU ASN PHE ILE LYS ILE PRO VAL VAL  
PRO HIS ASN GLU CYS SER GLU VAL MET SER ASN MET VAL SER GLU ASN  
MET LEU CYS ALA GLY ILE LEU GLY ASP ARG GLN ASP ALA CYS GLU GLY  
ASP SER GLY GLY PRO MET VAL ALA SER PHE HIS GLY THR TRP PHE LEU  
VAL GLY LEU VAL SER TRP GLY GLU GLY CYS GLY LEU LEU HIS ASN TYR  
GLY VAL TYR THR LYS VAL SER ARG TYR LEU ASP TRP ILE HIS GLY HIS  
ILE ARG ASP LYS GLU ALA PRO GLN LYS SER TRP ALA PRO-COOH<sub>2</sub>



ahol

- |                 |                                        |
|-----------------|----------------------------------------|
| R <sub>1</sub>  | ASP vagy LEU,                          |
| R <sub>2</sub>  | GLN vagy HIS,                          |
| R <sub>3</sub>  | GLU vagy LYS,                          |
| R <sub>4</sub>  | ASP vagy LEU,                          |
| R <sub>5</sub>  | GLN,                                   |
| R <sub>6</sub>  | VAL vagy THR,                          |
| R <sub>7</sub>  | ASP, PHE vagy TYR,                     |
| R <sub>8</sub>  | PRO,                                   |
| R <sub>9</sub>  | ARG,                                   |
| R <sub>10</sub> | LEU vagy THR,                          |
| R <sub>11</sub> | ILE vagy egy deléció, és ahol          |
| R <sub>12</sub> | ASN és -COOH a karboxilterminális vég: |
- b/ a dezoxi-ribonukleinsav szekvencia expresszióját irányító promoter;
- B) az A) lépésben traszformált gazdasejtet az adott dezoxi-ribonukleinsav szekvencia expresszióját megengedő körülmények között tenyésztjük, és
- C) a tenyészetből elkülönítjük a C) protein zimogén alakját.



13. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a B) lépésben tenyésztett gazdasejtet az alábbiak közül választjuk: 293/pLPC-N, 293/pGT-N, 293/pLPC-FN, 293/pLPC-SC, 293/pLPC-LIN és 293/pLPC-FLIN.

A meghatalmazott

Ügyvelei és Szabadalmi Iroda  
1061 Budapest,  
Dakota u. 10.  
Telefon 153-3733, 131-4200

100 oldal  
+ 8 ábrával

108 oldal

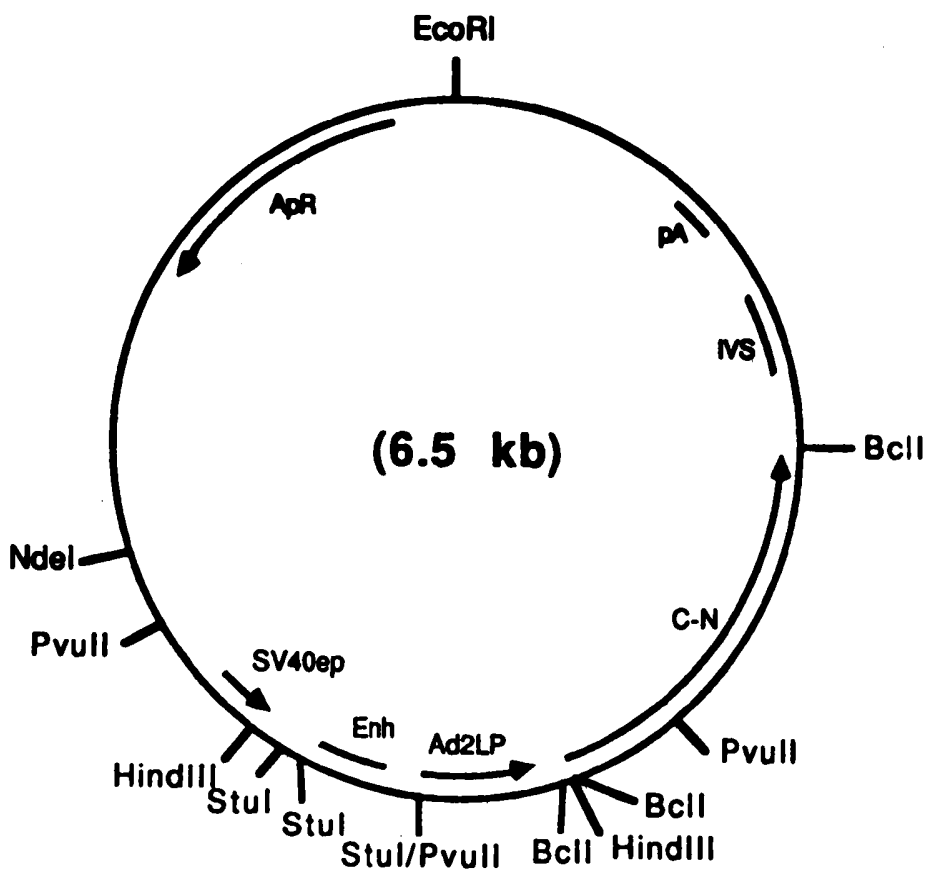
javított ábrák  
kérés

2.1



61152

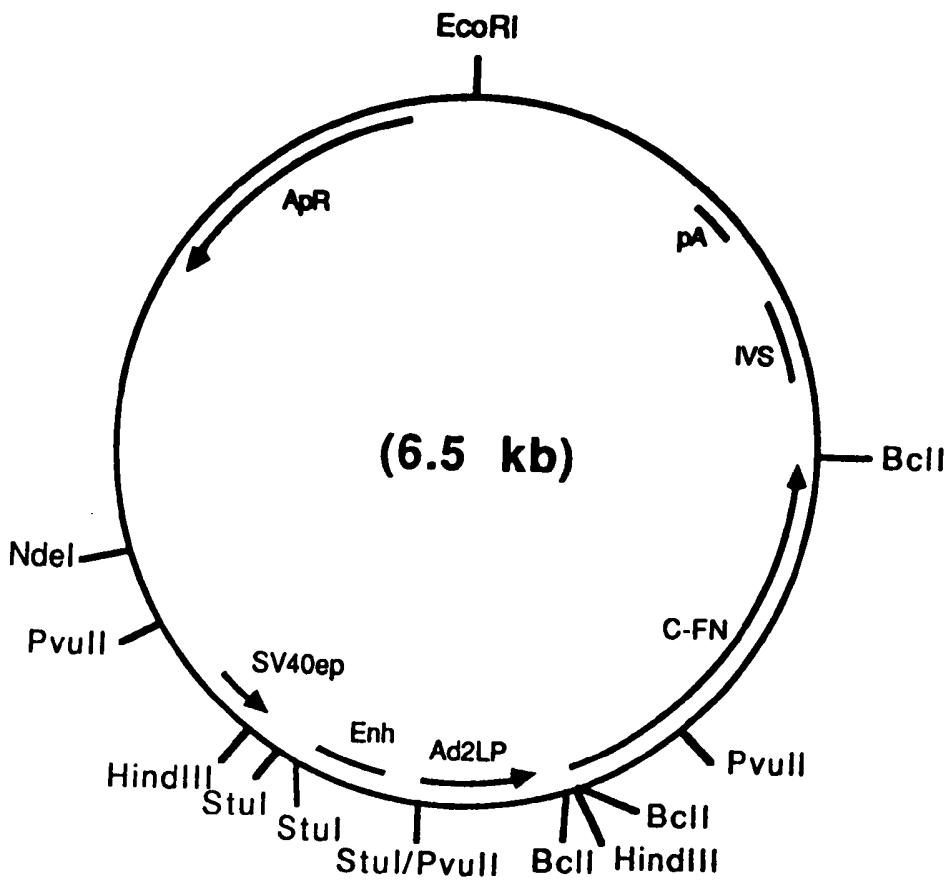
FIG.1



pLPC-N



**FIG.2**



**pLPC-FN**

FIG.3

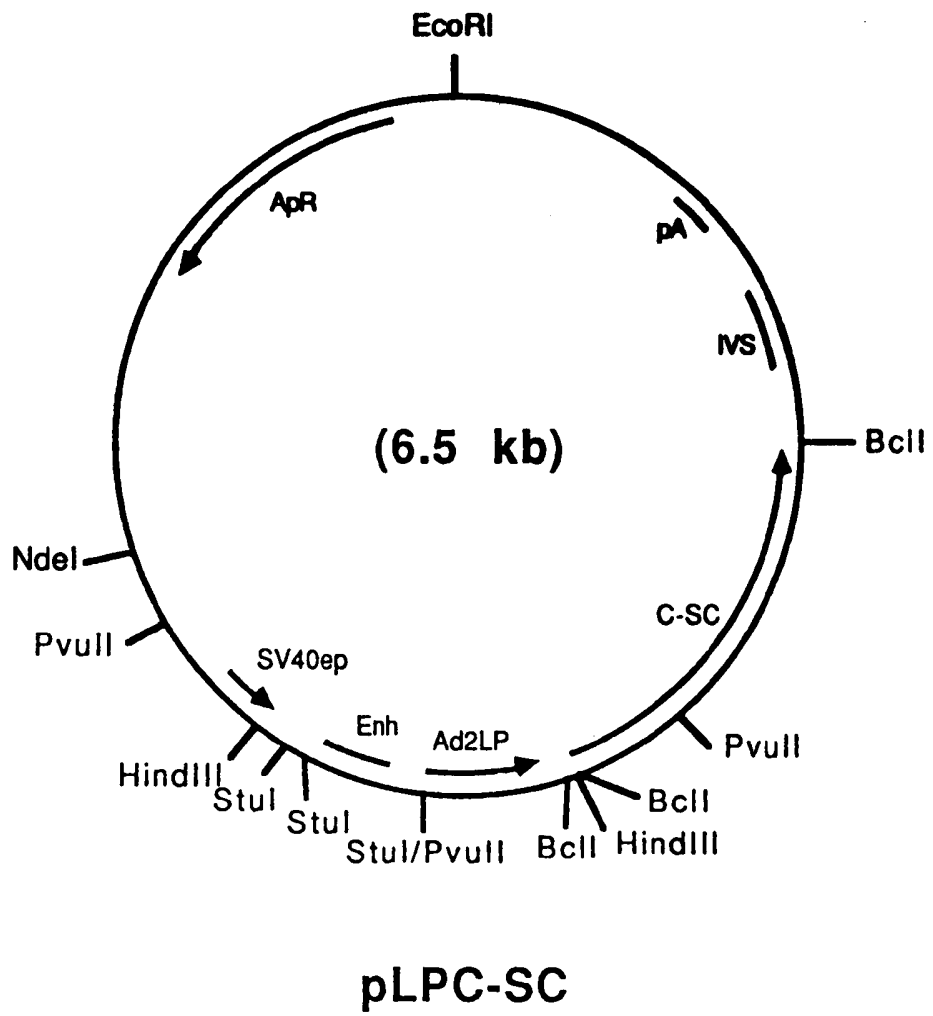
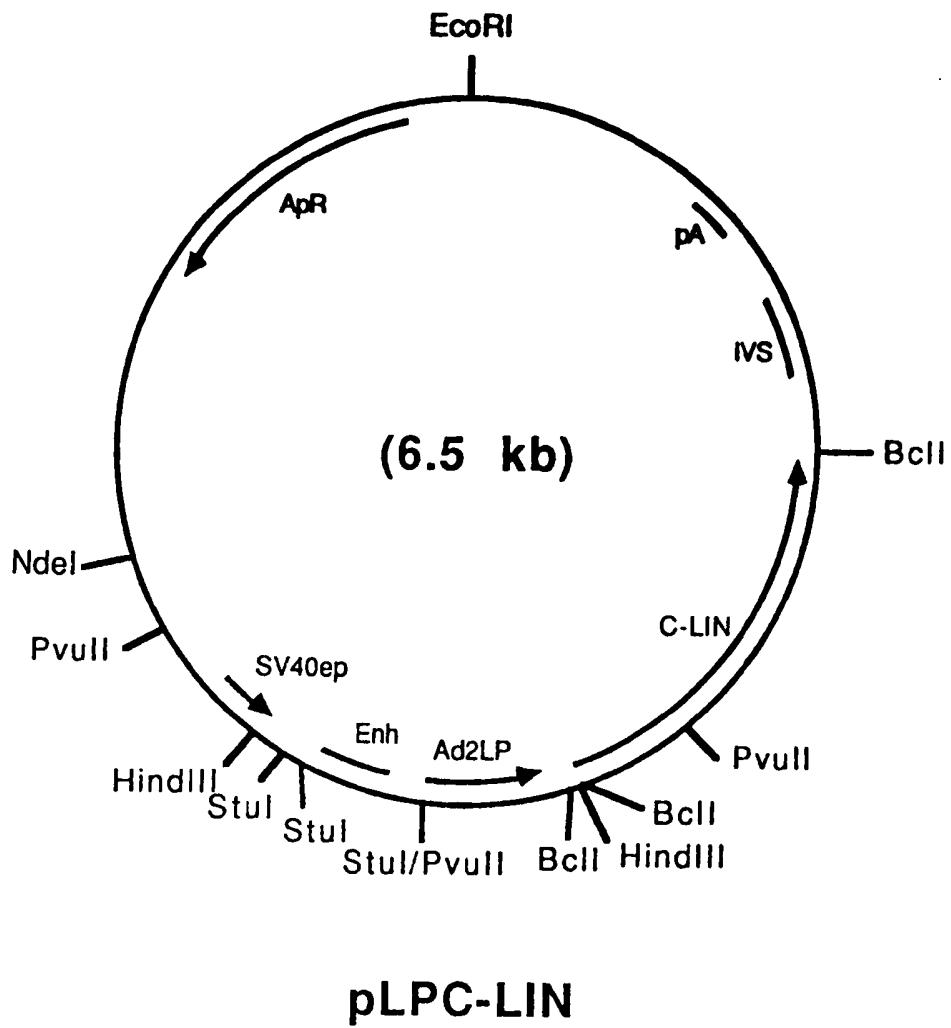
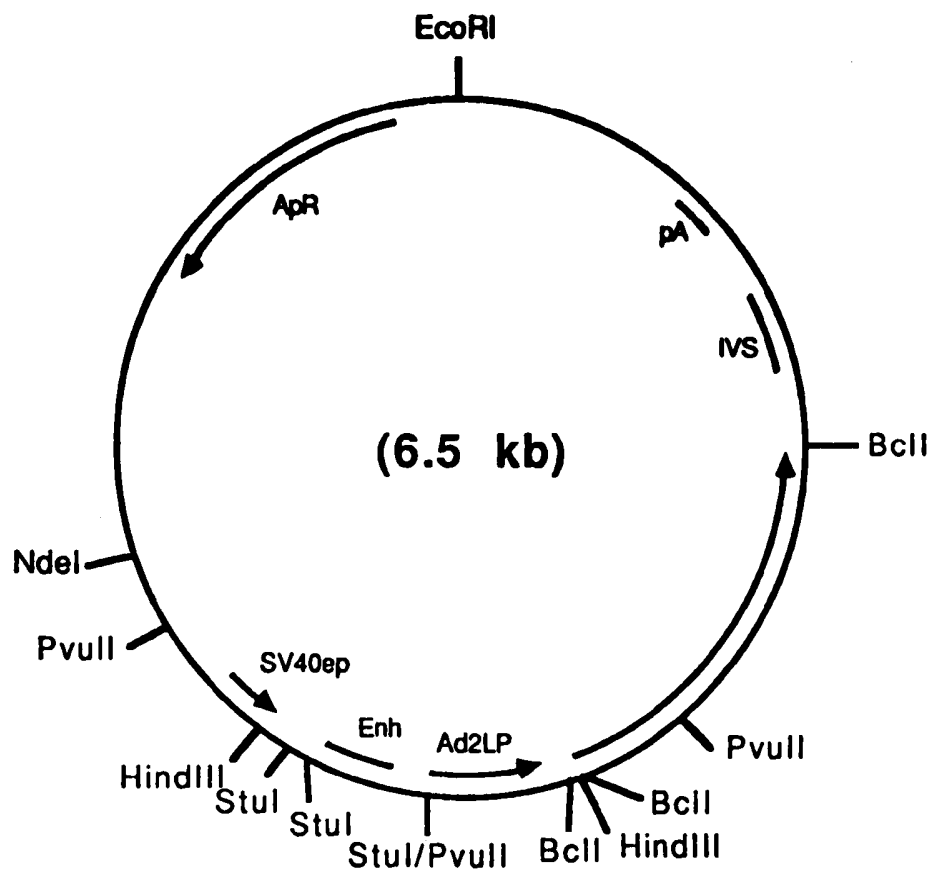




FIG. 4

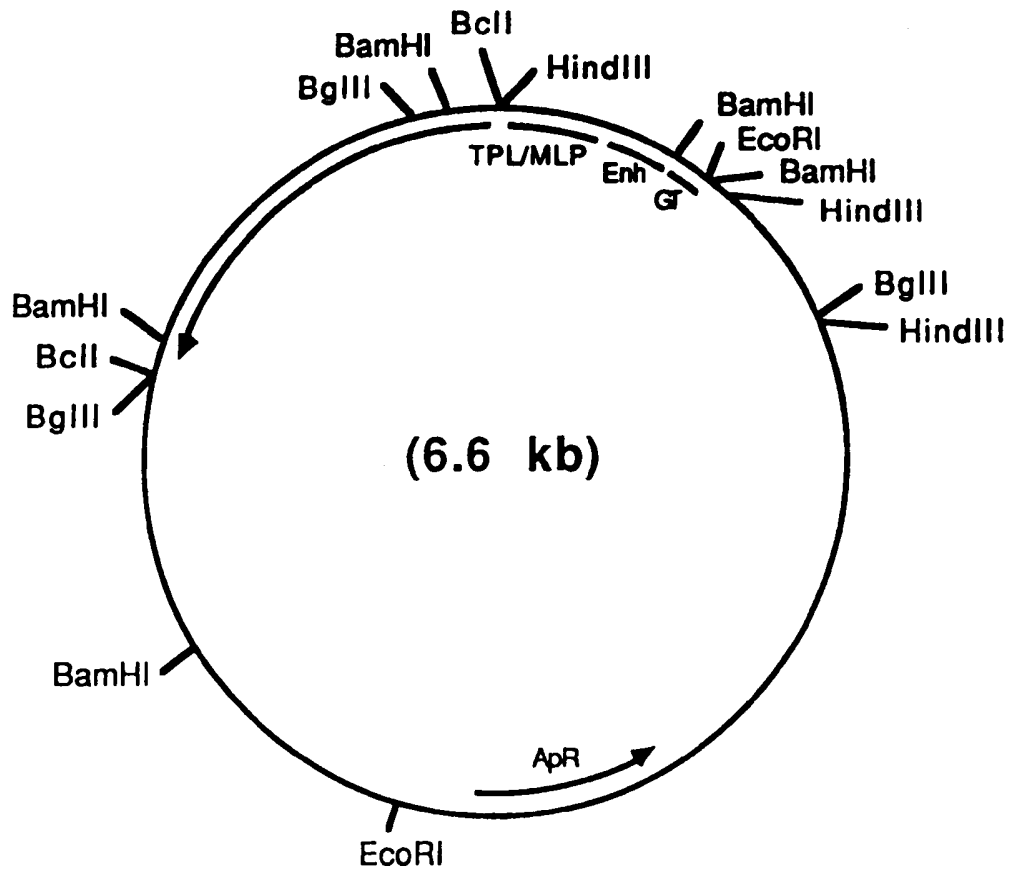


**FIG.5**



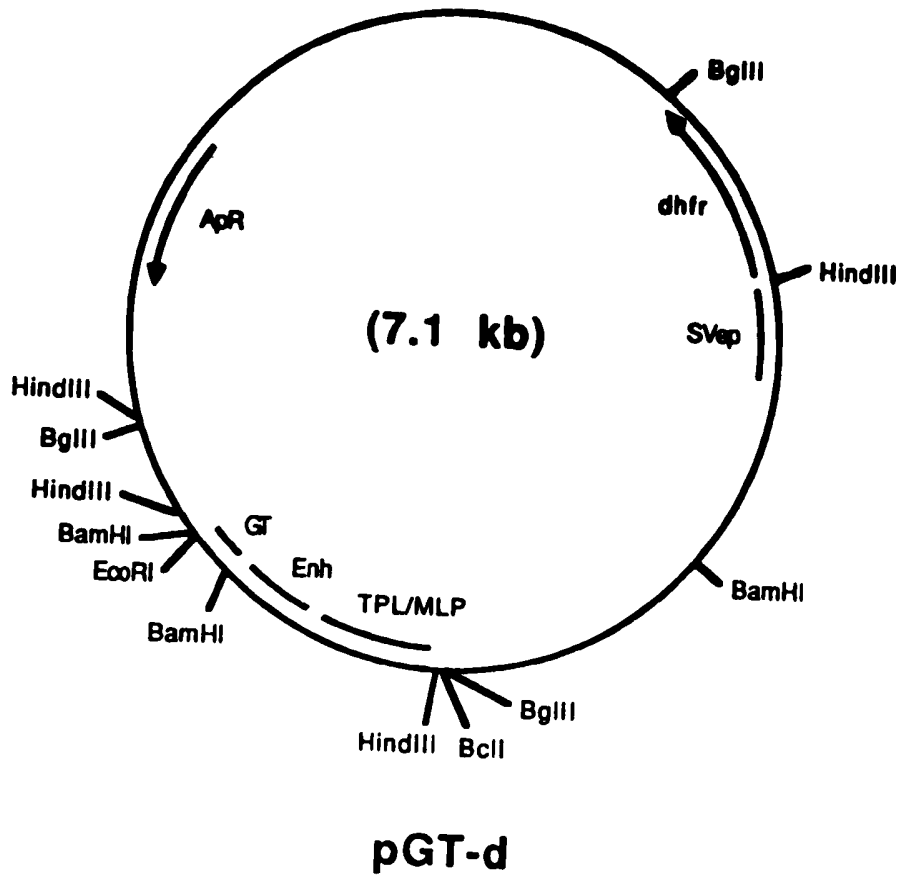
**pLPC-FLIN**

FIG. 6



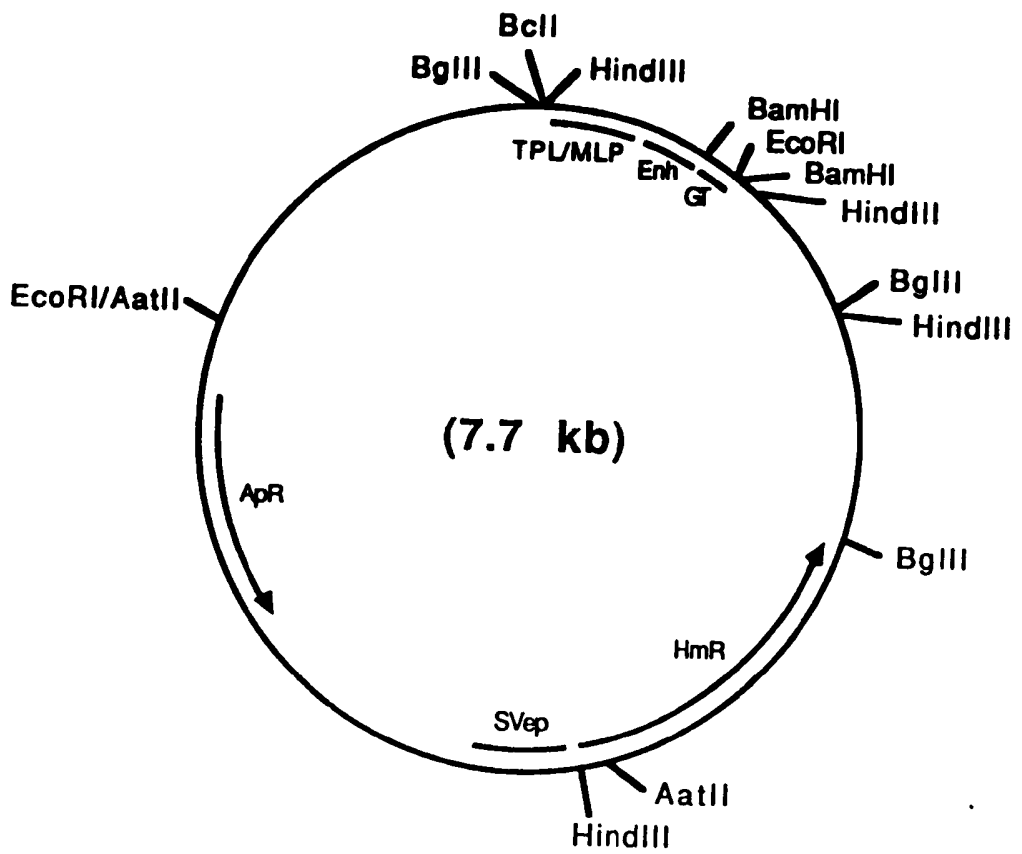
pGTC

FIG.7



Dr. Csilla Iroda  
Budapest,  
Munkacsy u. 10.  
1133, 131-4200

FIG. 8



pGT-h