



(19) **HU**

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: **226 419**

(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 99 02698**

(22) A bejelentés napja: **1997. 03. 10.**

(40) A közzététel napja: **1999. 11. 29.**

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2008. 12. 29.**

(51) Int. Cl.: **C12N 15/15** (2006.01)

A61K 38/57 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 97/03894

(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 9733996**

(30) Elsőbbségi adatok:

60/013,106 1996. 03. 11. **US**

60/019,793 1996. 06. 14. **US**

08/725,251 1996. 10. 04. **US**

(72) Feltalálók:

Davis, Gary, Milford, Connecticut (US);

Delaria, Katherine A., West Haven,

Connecticut (US);

Marlor, Christopher W., Bethany,

Connecticut (US);

Muller, Daniel K., Orange, Connecticut (US);

Tamburini, Paul P., Kensington,

Connecticut (US)

(73) Jogosult:

Aerovance, Inc., Berkeley, CA (US)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,

Budapest

(54)

Humán bikunin

(57) Kivonat

A találmány tárgyát képezik lényegében tisztított, szerinproteáz-aktivitású, meghatározott szekvenciájú fragmenseket tartalmazó proteinek, amely szekvenciák egyes aminosavpozíciói a 4F. ábra szerinti, natív, humán placenta-bikunin aminosavszekvenciájának megfelelően vannak számozva, és amely aminosavszekvenciában a szignálpeptid eltávolításával nyert N-terminális aminosav az 1. aminosav.

A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti szerinproteáz-aktivitást gátló proteinek előállítására alkalmas nukleinsavkonstrukciók, vektorok és gazdasejtek, ilyen proteinek tartalmazó gyógyászati készítmények, valamint eljárások azok alkalmazására.

A találmány szerinti megoldás alkalmas számos olyan betegség kezelésére és megelőzésére, amelyek kialakulásában szerinproteáz-aktivitás játszik szerepet.

HU 226 419 B1

A találmány tárgyát képezik szerinproteáz-aktivitást gátló, lényegében tisztított proteinek, amelyek az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 45., 47., 49., 50. vagy 52. aminosavszekvenciák bármelyikét tartalmazzák, amely szekvenciák egyes aminosavpozíciói a 4F. ábra szerinti, natív, humán placenta-bikunin aminosavszekvenciájának megfelelően vannak számozva, és amely aminosavszekvenciában a szignálpeptid eltávolításával nyert N-terminális aminosav az 1. aminosav. A találmány tárgyát képezik továbbá az 52., 49., 2., 45., 47., 3., 50. vagy 1. azonosító számú szekvenciák bármelyikét tartalmazó, fenti proteineket kódoló izolált nukleinsavszekvenciák. A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti szerinproteáz-aktivitást gátló proteinek előállítására alkalmas nukleinsavkonstrukciók, vektorok és gazdasejtek, ilyen proteineket tartalmazó gyógyászati készítmények, valamint eljárások azok alkalmazására.

A találmány szerinti megoldás előnyösen alkalmazható számos olyan betegség kezelésére és megelőzésére, amelyek kialakulásában szerinproteáz-aktivitás játszik szerepet.

Az alábbiakban ismertetjük a találmány előzményeit. A nagyobb sebészeti műtétek, például a nyitott szívűtét és más bonyolult sebészeti eljárások vele járó komplikációja a vérvesztés. Az átömlesztésre kerülő donorvér jelentős részét szívűtéten átvesztő egyéneknek alkalmazják. A vérátömlesztés különböző betegségek átvitelének és más, káros reakcióknak a kockázatát hordozza. Ráadásul a donorvér költséges, és az igényelt mennyiség gyakran meghaladja az utánpótlás mértékét. Vérvesztés és az azt követő vérátömlesztés szükségességének csökkentésére alkalmas gyógyszeres eljárásokat ismertetnek összefoglaló leírásukban Scott és munkatársai [Ann. Thorac. Surg. 50, 843–851 (1990)].

A Trasylo[®] gyógyszer hatóanyaga az aprotinin, amely a Kunitz-osztályba tartozó, szarvasmarha-eredetű szerinproteáz-gátló fehérje. Az aprotininről (Trasylo[®]-ról) leírták, hogy hatékonyan csökkenti az operáció előtti, alatti és utáni vérvesztést [Royston és munkatársai: Lancet *ii*, 1289–1291 (1987); Dietrich és munkatársai: Thorac. Cardiovasc. Surg. 37, 89–91 (1989); W. van Oeveren és munkatársai: Ann. Thorac. Surg. 44, 640–645; Bistrup és munkatársai: Lancet *i*, 366–367 (1988)], de beszámoltak mellékhatásokról, például vérnyomásesésről és bőrpirosodásról [Bohrer és munkatársai: Anesthesia 45, 853–854 (1990)], valamint allergiás reakciókról is [Dietrich és munkatársai, lásd fentebb]. A korábban aprotininnel kezelt egyének ugyanezen készítménnyel történő ismételt kezelése nem ajánlott [Dietrich és munkatársai, lásd fentebb]. Trasylo[®]-t alkalmaztak hiperfibrinolitikus vérzés és traumás vérzéses sokk kezelésére.

Ismert, hogy az aprotinin számos szerinproteázt gátl, így például a tripszint, kimotripszint, plazmint és kal-

likreint; ennek megfelelően, terápiás célból alkalmazzák heveny hasnyálmirigy-gyulladás, sokkszindróma különböző állapotai, hiperfibrinolitikus vérzés és szívizominfarktus kezelésére [Trapnell és munkatársai: Brit. J. Surg. 61, 177 (1974); McMichan és munkatársai: Circulatory Shock 9, 107 (1982); Auer és munkatársai: Acta Neurochir. 49, 207 (1979); Sher: Am. J. Obstet. Gynecol. 129, 164 (1977); Schneider: Artzheim.–Firsch. 26, 1606 (1976)]. Általában elfogadott, hogy a Trasylo[®] *in vivo* a kallikrein és plazmin gátlása révén csökkenti a vérvesztést. Ismertté vált, hogy a natív aprotininnel összehasonlítva, a (3–58, Arg15, Ala17, Ser42)-aprotinin javított plazmakallikrein-gátló hatást mutat (WO 89/10374 számú nemzetközi közzétételi irat).

Mivel az aprotinin szarvasmarha-eredetű, fennáll a kockázata annak, hogy a hatóanyag, humán betegben történő ismételt alkalmazása esetén, anafilaxiás reakciót vált ki. Ennek megfelelően, az anafilaxiás reakciónak csökkentése érdekében, előnyös volna, ha az aprotinin valamely humán eredetű funkcionális megfelelője rendelkezésre állna.

Ezenfelül az aprotinin nagy adagban történő ismételt alkalmazás esetén, rágcsálókban és kutyákban, nefrotoxikus tüneteket okoz [Bayer, Trasylo[®], Glasser és munkatársai: Inhibitor of proteinase, „Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 78. Kongress”, 1612–1614, Bergmann, München, (1972)]. Feltételezések szerint ez a hatás annak tulajdonítható, hogy az összességében erősen pozitív töltésű aprotinin felhalmozódik a negatív töltésű proximális vesecsatornában (WO 93/14120 számú nemzetközi közzétételi irat).

Ennek megfelelően, a találmány tárgyát képezi olyan humán eredetű proteinek azonosítása, amelyek aprotininhoz hasonló funkcionális aktivitást mutatnak. A találmány tárgyát képezi továbbá olyan humán eredetű proteinek azonosítása, amelyek kisebb töltéssel rendelkeznek, mégis az aprotininnel azonos, ahhoz nagyon hasonló, vagy ahhoz képest javított proteázspecifitást mutatnak, különös tekintettel a plazmin- és kallikreingátló tulajdonságra. Az ilyen gátlóproteinek ismételt beadhatók humán betegeknek, az immunválasz káros következményeinek, valamint a nefrotoxicitás kialakulásának alacsonyabb kockázata mellett.

Az alábbiakban röviden összefoglaljuk a találmány szerinti megoldás lényegét.

A találmány tárgyát képezi tisztított, humán szerinproteázt gátló proteint, amely humán placentaszövetből, affinitáskromatográfias eljárással lett izolálva.

A találmány tárgyát képezi egy újonnan azonosított humán proteint, amelyet a leírásban bikuninnak nevezünk, és amely két, Kunitz-osztályba tartozó szerinproteáz-gátló domént tartalmaz. A találmány egyik megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezik az alábbi aminosavszekvenciával rendelkező proteinek:

ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN	50
YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF	100
NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE	150
ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK VVVLGAVS	179

(1. azonosító számú szekvencia).

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezi natív, emberi placenta-

eredetű bikuninfehérje, amely az alábbi aminosavszekvenciával rendelkezik:

ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN	50
YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF	100
NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE	150
ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK	170

(52. azonosító számú szekvencia).

Egy szempontból a találmány szerinti protein biológiai aktivitása abban nyilvánul meg, hogy kötődik tripszinhez, humán plazma és szöveti eredetű kallikreinekhez, humán plazminhoz és Xlla-faktorhoz, és azok biológiai aktivitását lényegében gátolja. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a találmány tárgyát képezi natív, humán placenta-bikuninprotein, amely glikozilezett formában van. Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgyát képezi natív, humán bikuninprotein, amelyet úgy állítunk elő, hogy az legalább egy cisztein-cisztein diszulfidkötést tartalmazzon. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a protein legalább egy, láncon belüli cisztein-cisztein diszulfidkötést tartalmaz, a következő cisztein-aminosavpárok között: CYS11–CYS61, CYS20–CYS44, CYS36–CYS57, CYS106–CYS156, CYS115–CYS139, CYS131–CYS152; ahol a ciszteineket a natív, humán placenta-bikunin aminosavszekvenciája szerint számoztuk. Szakember számára nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti protein úgy is megfelelő háromdimenziós konformációba hajtogatódhat („folding”), a natív humán bikunin biológiai aktivitásának megmaradása mellett, hogy a láncon belüli natív cisztein-cisztein diszulfidkötések közül egy sincs jelen; vagy azok közül egy vagy több van jelen; vagy az összes ilyen kötés jelen van. A találmány egy igen előnyös megvalósítási módja

10 szerint a találmány szerinti protein megfelelően hajtogatódott („folded”), és valamennyi megfelelő natív cisztein-cisztein diszulfidkötés létrejöttével alakul ki.

A találmány szerinti aktív proteineket tisztíthatjuk emberi szövetből, például placentából, vagy előállíthatjuk szintetikus proteinkémiai eljárásokkal, amint azt az alábbi példákkal szemléltetjük. Nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti proteineket előállíthatjuk molekuláris biológiai technikákkal is, amelyek szerint a találmány szerinti proteineket önmagukat replikálni képes vektorokkal expresszálatjuk, transzformált sejtekben. Ilyen proteineket előállíthatunk transzformált sejtekben, nem szekretálódó vagy szekretálódó formában. Hogy megkönnyítsük a transzformált sejtekből történő szekretálódást, és hogy növeljük a transzlatálódott protein funkcionális stabilitását, vagy hogy segítsük a bikuninprotein hajtogatódását, a natív, humán bikuninprotein NH2-terminális végéhez bizonyos szignálpeptid-szekvenciákat kapcsolhatunk.

20 A találmány tárgyát képezik tehát natív humán bikuninproteinek, amelyekben a natív szignálpeptid-szekvencia legalább egy része intakt. Ennek megfelelően, a találmány tárgyát képezik a szignálpeptid legalább egy részét tartalmazó, alábbi aminosavszekvenciájú natív, humán bikuninproteinek:

AGSFLAWLGSLLLSGVLA	-1
ADRERSIHDFCLVSKVVGRCRASMPRWYNVTDGSCQLFVYGGCDGNSNN	50
YLTKEECLKKCATVTENATGDLATSRNAADSSVPSAPRRQDSEDHSSDMF	100
NYEEYCTANAVTGPCRASFPRWYFDVERNSCNNFIYGGCRGNKNSYRSEE	150
ACMLRCFRQQENPPLPLGSKVVVLGAVS	179

(2. azonosító számú szekvencia).

Előnyösen, a találmány tárgyát képezi az intakt vezető- („leader”) szekvencia egy részét tartalmazó placenta-bikuninprotein, amely az 52. azonosító számú szekvencia szerinti szekvenciát tartalmaz, az alábbi aminosavszekvenciájú intakt vezetőszezmenssel kiegészítve:

MAQLCGL RRSRAFLALL GSLLLSGVLA -1;
(53. azonosító számú szekvencia).

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezi továbbá az intakt vezető-szekvencia egy részét tartalmazó bikuninprotein, amely az 52. azonosító számú szekvencia szerinti szekvenciát tartalmaz, az alábbi aminosavszekvenciájú intakt vezetőszezmenssel kiegészítve:

MLR AEADGVSRL GSLLLSGVLA -1;
(54. azonosító számú szekvencia).

A leírásunkban alkalmazott előnyös számozási rendszer szerint +1-gyel a natív, humán placenta-bi-

45 kuninprotein aminosavszekvenciájának NH2-végét jeleltük. Szakember számára nyilvánvaló, hogy a natív, humán placenta-bikuninból funkcionális proteinfragmensek állíthatók elő, amelyek megtartották a natív, humán placenta-bikunin biológiai aktivitásának legalább egy részét, és szerinproteáz-gátló anyagként viselkednek.

50 A találmány egy megvalósítási módja szerint a találmány szerinti proteinek tartalmazzák a natív, humán placenta-bikunin legalább egy funkcionális Kunitz-szerű domént hordozó fragmensét, amely fragmens a natív, humán placenta-bikunin 7–159. aminosavát tartalmazza, és amelyet a továbbiakban „bikunin (7–159.)”-fragmensnek nevezünk. Ennek megfelelően, a találmány tárgyát képezi az alábbi aminosavszekvenciával rendelkező protein:

60

IHDFCLVSKVVGRCRASMPRWYVNTDGSCQLFVYGGCDGNSNN	50
YLTKEECLKCCATVTENATGDLATSRNAADSSVPSAPRRQDSEDHSSDMF	100
NYEEYCTANAVTGPCRASFPWRWYFDVERNSCNNFIYGGCRGNKNSYRSEE	150
ACMLRCFRQ	159

(3. azonosító számú szekvencia);

ahol az aminosavak számozása a natív, humán placenta-bikunin aminosavsorozásának felel meg. A találmány szerinti további funkcionális variáns a natív, humán placenta-bikunin azon fragmense, amely 10 legalább egy funkcionális Kunitz-szerű domént hordoz, és amely a natív, humán placenta-bikunin 11–156. aminosavsorozációját tartalmazza [a továbbiakban: „bikunin (11–156.)”]:

CLVSKVVGRCRASMPRWYVNTDGSCQLFVYGGCDGNSNN	50
YLTKEECLKCCATVTENATGDLATSRNAADSSVPSAPRRQDSEDHSSDMF	100
NYEEYCTANAVTGPCRASFPWRWYFDVERNSCNNFIYGGCRGNKNSYRSEE	150
ACMLRC	156

(50. azonosító számú szekvencia).

Nyilvánvaló, hogy az egyes Kunitz-szerű domének szintén a natív, humán placenta-bikunin fragmensei. Közelebbről, a találmány tárgyát képezi az első Kunitz-szerű domén aminosavsorozációját tartalmazó protein, amely a natív, humán placenta-bikunin aminosav-sorozációjának 7–64. aminosavát tartalmazza [a továbbiakban: „bikunin (7–64.)”]. Ennek megfelelően, a találmány tárgyát képezi protein, amely legalább egy Kunitz-szerű domént tartalmaz, és az alábbi aminosav-sorozációval rendelkezik:

IHDFCLVSKVVGRCRASMPRWYVNTDGSCQLFVYGGCDGNSNN	50
YLTKEECLKCCATV	64

(4. azonosító számú szekvencia);

ahol az aminosavak számozása a natív, humán placenta-bikunin aminosavsorozásának felel meg. A találmány tárgyát képezi továbbá egy első Kunitz-szerű domén, amely a natív, humán placenta-bikunin aminosavsorozációjának 11–61. aminosavát tartalmazza [a továbbiakban: „bikunin (11–61.)”], és amely az alábbi aminosavsorozációval rendelkezik:

CLVSKVVGRCRASMPRWYVNTDGSCQLFVYGGCDGNSNN	50
YLTKEECLKCC	61

(5. azonosító számú szekvencia).

A találmány tárgyát képezi továbbá egy protein, amely Kunitz-szerű doménnek megfelelő aminosavsorozációt tartalmaz, ezenfelül tartalmazza a natív, humán placenta-bikunin aminosavsorozációjának 102–159. aminosavait [a továbbiakban: „bikunin (102–159.)”]. Ennek megfelelően, a találmány tárgyát képezi protein, amely legalább egy Kunitz-szerű domént tartalmaz, és az alábbi aminosavsorozációval rendelkezik:

YEEYCTANAVTGPCRASFPWRWYFDVERNSCNNFIYGGCRGNKNSYRSEE	150
ACMLRCFRQ	159;

(6. azonosító számú szekvencia);

ahol az aminosavak számozása a natív, humán placenta-bikunin aminosavsorozásának felel meg. A fenti domén további formája olyan Kunitz-szerű domén, amely tartalmazza a natív, humán placenta-bikunin aminosavsorozációjának 106–156. aminosavait [a továbbiakban: „bikunin (106–156.)”], és az alábbi aminosavsorozációval rendelkezik:

CTANAVTGPCRASFPWRWYFDVERNSCNNFIYGGCRGNKNSYRSEE	150
ACMLRC	156;

(7. azonosító számú szekvencia).

Szakember számára nyilvánvaló, hogy előállíthatók a natív, humán bikuninprotein olyan fragmensei, amelyek a natív protein biológiai aktivitásának legalább egy részét megtartották. Az ilyen fragmensek különböző orientációban vagy többszörösen kombinálhatók, hogy olyan alternatív proteinekhez kapjunk, amelyek a natív, humán bikuninprotein biológiai aktivitásának egy részét megtartották; vagy azzal azonos vagy annál nagyobb mértékű biológiai aktivitást mutatnak. Szakember számára világos, hogy a találmány szerinti aktív proteinek tartalmazhatnak egy vagy több, ta-

lálomány szerinti Kunitz-szerű domént, más forrásokból származó további Kunitz-szerű doménnel kombinálva. A találmány szerinti, biológiailag aktív proteinek tartalmazhatnak egy vagy több, találmány szerinti Kunitz-szerű domént, más forrásokból származó, és különböző biológiai aktivitásokkal rendelkező további Kunitz-szerű doménnel kombinálva. A találmány szerinti proteinek biológiai aktivitását kombinálhatjuk más, ismert protein vagy proteinek biológiai aktivitásával, hogy kiszámítható biológiai aktivitást mutató többfunk-

5

ciós fúziós proteineket állítsunk elő. Ennek megfelelően, a találmány tárgyát képezik proteinek, amelyek legalább egy, az 5. vagy a 7. azonosító számú szekvenciák szerinti aminosavszekvenciával azonos, vagy azokkal funkcionálisan ekvivalens aminosavszekvencia-szegmenst tartalmaznak.

10

Korai stopkodónál végződő nyitott olvasási keret is kódolhat funkcionális proteint. A találmány tárgykörébe tartozik ilyen, alternatív korai végződés, valamint az alábbi aminosavszekvenciával rendelkező protein:

ADRERSIHDFCLVSKVVGRCRASMPrWWYNVTDGSCQLFVYGGCDGNSNN 50
YLTKEECLKKCATVTENATGDLATSRNAADSSVPSAPRRQDS 92;
(8. azonosító számú szekvencia).

A találmány tárgyát képezi lényegében tisztított, vagy rekombináns eljárással előállított natív, humán bikuninprotein, amelyet a vezetőszekvencia intakt szegmensével, valamint a natív transzmembránrégió legalább egy intakt részével egészítettünk ki. Ennek meg-

20

felelően, a találmány tárgyát képezi a vezetőszekvencia egy intakt szegmensét, valamint a transzmembrán-domén (aláhúzással jelölve) legalább egy részét tartalmazó natív, humán bikunin, amely az alábbi aminosavszekvenciák valamelyikével rendelkezik:

1) EST	MLR AEADGVSRL	GSLLLSGVLA	-1
2) PCR	MAQLCGL RRSRAFLALL	GSLLLSGVLA	-1
3) λcDNA	MAQLCGL RRSRAFLALL	GSLLLSGVLA	-1
1) ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN			50
2) ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN			50
3) ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWWYN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN			50
1) YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF			100
2) YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF			100
3) YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF			100
1) NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE			150
2) NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE			150
3) NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE			150
1) ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK VVVLAGLFVM VLILFLGASM VYLIRVARRN			200
2) ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK VVVLAGLFVM VLILFLGASM VYLIRVARRN			200
3) ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK VVVLAGLFVM VLILFLGASM VYLIRVARRN			200
1) QERALRTVWS SGDDKEQLVK NTYVL			225
2) QERALRTVWS FGD			213
3) QERALRTVWS SGDDKEQLVK NTYVL			225

ahol az 1. szekvencia az EST-eredetű konszenzus-szekvencia (45. azonosító számú szekvencia); a 2. szekvencia PCR-klón szekvenciája (47. azonosító számú szekvencia); a 3. szekvencia a lambda-cDNS-klón szekvenciája (49. azonosító számú szekvencia). Előnyösen, a találmány szerinti protein a 45., 47. vagy 49. azonosító számú szekvenciák valamelyike szerinti olyan aminosavszekvenciát tartalmaz, amelyben a pro-

50

tein az utolsó Kunitz-domén vége és a transzmembránrégió közti régióban hasítódott.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan proteinek, amelyekből a szignálopeptid deletálva lett. Ennek megfelelően, a találmány tárgyát képezi protein, amely az 52. azonosító számú szekvencia szerinti aminosavszekvenciával folytatódólagosan, az alábbi transzmembrán-aminosavszekvenciák valamelyikét tartalmazza:

EST VVVLAGLFVM VLILFLGASM VYLIRVARRN 200
EST QERALRTVWS SGDDKEQLVK NTYVL 225;
(69. azonosító számú szekvencia); vagy
PCR VVVLAGLFVM VLILFLGASM VYLIRVARRN 200
PCR QERALRTVWS FGD 213;
(68. azonosító számú szekvencia); vagy

λcDNS VVVLGLFVM VLILFLGASM VYLIRVARRN
 λcDNS QERALRTVWS SGDDKEQLVK NTYVL
 (67. azonosító számú szekvencia).

200
 225;

A találmány szerinti proteinek aminosavszekvenciái szakember számára egyértelmű kitanítást jelentenek a megfelelő nukleinsavszekvenciákra vonatkozólag, amelyek molekuláris biológiai eljárások során történő alkalmazásával a találmány szerinti proteinek előállíthatók. Ennek megfelelően, a találmány tárgyát képezi humán bikunint kódoló, a 3. ábra szerinti konszenzus-DNS-szekvenciájú nukleinsavszekvencia (9. azonosító számú szekvencia), amely a 3. ábra szerinti (10. azonosító számú szekvencia) natív, humán placenta-bikunin aminosavszekvenciájának translációját eredményezi. A találmány tárgyát képezi továbbá a 4C. ábra szerinti (51. azonosító számú szekvencia) konszenzus-nukleinsavszekvencia, amely a 4D. ábra szerinti (45. azonosító számú szekvencia) aminosavszekvenciát kódol.

A találmány tárgyát képezi továbbá a 4F. ábra szerinti (48. azonosító számú szekvencia) DNS-szekvenciájú, natív, humán placenta-bikunint kódoló nukleinsavszekvencia, amely a 49. azonosító számú szekvencia szerinti proteinszekvenciát kódol. Ezenfelül a találmány tárgyát képezi a 4E. ábra szerinti nukleinsavszekvencia (46. azonosító számú szekvencia), amely a 47. azonosító számú szekvencia szerinti proteinszekvenciát kódol.

Szakember számára világos, hogy nukleotidszekvenciában létrehozhatunk bizonyos allélikus mutációkat és konzervatív szubsztitúciókat, úgy, hogy azok mégis a találmány szerinti proteinek aminosavszekvenciájának keletkezését eredményezzék. Szakember számára ismert továbbá, hogy a találmány szerinti pro-

tein bizonyos természetes allélikus mutációi, valamint a találmány szerinti protein aminosavait érintő konzervatív szubsztitúciók nem változtatják meg lényegesen a protein biológiai aktivitását, és az ilyen proteinek szintén a találmány tárgykörébe tartoznak.

A találmány tárgyát képezik továbbá humán, placenta-bikunint vagy annak fragmentumait tartalmazó gyógyászati készítmények, amelyek alkalmasak sebészeti beavatkozásnak alávetett egyénben, az operáció előtti, alatti, valamint utáni vérvesztés mértékének csökkentésére.

A találmány tárgyát képezik továbbá eljárások, amelyek sebészeti beavatkozásnak alávetett egyénben csökkentik az operáció előtti, alatti és utáni vérvesztés mértékét, amelyek szerint a betegnek a találmány szerinti szerinproteáz-gátló protein hatékony mennyiségét adjuk be, biológiailag elfogadható hordozóanyagban.

A találmány tárgyát képezik továbbá placenta-bikunin és a fent ismertetett specifikus Kunitz-domének variánsai, amelyek proteázspecifitást módosító aminosavsubsztitúciókat tartalmaznak. A natív, placenta-bikunin aminosavszekvenciájában előforduló előnyös szubsztitúciós helyeket az alábbiakban Xaa¹-Xaa³² pozícióként jelöltük A bikunin (7-64.)-variánsok esetében előnyösen az Xaa¹-Xaa¹⁶ pozíciókban hozhatunk létre szubsztitúciót, míg a bikunin (102-159.)-variánsok esetén előnyösen az Xaa¹⁷-Xaa³² pozíciókban hozhatunk létre szubsztitúciót.

Ennek megfelelően, a találmány tárgyát képezi az alábbi aminosavszekvenciájú protein:

Ala Asp Arg Glu Arg Ser Ile Xaa ¹ Asp Phe	10
Cys Leu Val Ser Lys Val Xaa ² Gly Xaa ³ Cys	20
Xaa ⁴ Xaa ⁵ Xaa ⁶ Xaa ⁷ Xaa ⁸ Xaa ⁹ Trp Trp Tyr Asn	30
Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Xaa ¹⁰	40
Tyr Xaa ¹¹ Gly Cys Xaa ¹² Xaa ¹³ Xaa ¹⁴ Ser Asn Asn	50
Tyr Xaa ¹⁵ Thr Lys Glu Glu Cys Leu Lys Lys	60
Cys Ala Thr Xaa ¹⁶ Thr Glu Asn Ala Thr Gly	70
Asp Leu Ser Thr Ser Arg Asn Ala Ala Asp	80
Ser Ser Val Pro Ser Ala Pro Arg Arg Gln	90
Asp Ser Glu His Asp Ser Ser Asp Met Phe	100
Asn Tyr Xaa ¹⁷ Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala	110
Val Xaa ¹⁸ Gly Xaa ¹⁹ Cys Xaa ²⁰ Xaa ²¹ Xaa ²² Xaa ²³ Xaa ²⁴	120
Xaa ²⁵ Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg Asn Ser	130
Cys Asn Asn Phe Xaa ²⁶ Tyr Xaa ²⁷ Gly Cys Xaa ²⁸	140
Xaa ²⁹ Xaa ³⁰ Lys Asn Ser Tyr Xaa ³¹ Ser Glu Glu	150
Ala Cys Met Leu Arg Cys Phe Arg Xaa ³² Gln	160
Glu Asn Pro Pro Leu Pro Leu Gly Ser Lys	170
Val Val Val Leu Ala Gly Ala Val Ser	179

(11. azonosító számú szekvencia);

ahol az Xaa¹-Xaa³² pozíciók mindegyike egymástól függetlenül természetben előforduló aminosavat képvisel, kivéve ciszteint, azzal a kikötéssel, hogy az Xaa¹-Xaa³² aminosavak legalább egyike különbözik a

natív szekvencia megfelelő pozíciójában található aminosavtól.

Leírásunkban a „természetben előforduló aminosav” elnevezés alatt a 20 általánosan előforduló amini-

sav (azaz Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr és Val) valamelyikét értjük.

A fent jelzett egy vagy több pozícióban létrehozott egy vagy több aminosavszubsztitúcióval meg lehet változtatni a natív, placenta-bikunin vagy az egyedi Kunitz-szerű doménok gátlási specificitásának a profilját, úgy, hogy az kiemelten gátoljon más szerinproteázokat, például, de anélkül, hogy igényünket az alábbiakra korlátoznánk, a komplementkaskád enzimeit, a TF/FVIIa, Fxa, trombin, neutrofil elasztáz, katepszin-G vagy proteináz-3 szerinproteázokat.

A placenta-bikunin előnyös variánsai például azok a proteinek, amelyekben az Xaa¹ szubsztitúciós helyen His, Glu, Pro, Ala, Val vagy Lys, előnyösebben His vagy Pro aminosav található; vagy amelyekben az Xaa² szubsztitúciós helyen Val, Thr, Asp, Pro, Arg, Tyr, Glu, Ala vagy Lys, előnyösebben Val vagy Thr aminosav található; vagy amelyekben az Xaa³ szubsztitúciós helyen Arg, Pro, Ile, Leu vagy Thr, előnyösebben Arg vagy Pro aminosav fordul elő; vagy amelyekben az Xaa⁴ szubsztitúciós helyen Arg, Lys vagy Ser, Gln, előnyösebben Arg vagy Lys aminosav található; vagy amelyekben az Xaa⁵ szubsztitúciós helyen Ala, Gly, Asp vagy Thr, előnyösebben Ala aminosav található; vagy amelyekben az Xaa⁶ szubsztitúciós helyen Ser, Ile, Tyr, Asn, Leu, Val, Arg vagy Phe, előnyösebben Ser vagy Arg aminosav található; vagy amelyekben az Xaa⁷ szubsztitúciós helyen Met, Phe, Ile, Glu, Leu, Thr vagy Val, előnyösebben Met vagy Ile aminosav található; vagy amelyekben az Xaa⁸ helyen Pro, Lys, Thr, Gln, Asn, Leu, Ser vagy Ile, előnyösebben Pro vagy Ile aminosav található; vagy amelyekben az Xaa⁹ szubsztitúciós helyen Arg, Lys vagy Leu, előnyösebben Arg aminosav található; vagy amelyekben az Xaa¹⁰ szubsztitúciós helyen Val, Ile, Lys, Ala, Pro, Phe, Trp, Gln, Leu vagy Thr, előnyösebben Val aminosav található; vagy amelyekben az Xaa¹¹ szubsztitúciós helyen Gly, Ser vagy Thr, előnyösebben Gly aminosav fordul elő; vagy amelyekben az Xaa¹² szubsztitúciós helyen Asp, Arg, Glu, Leu, Gln vagy Gly, előnyösebben Asp vagy Arg aminosav található; vagy amelyekben az Xaa¹³ szubsztitúciós helyen Gly vagy Ala aminosav található; vagy amelyekben az Xaa¹⁴ szubsztitúciós helyen Asn vagy Lys aminosav található; vagy amelyekben az Xaa¹⁵ szubsztitúciós helyen Gly, Asp, Leu, Arg, Glu, Thr, Tyr, Val vagy Lys, előnyösebben Leu vagy Lys aminosav található; vagy amelyekben az Xaa¹⁶ szubsztitúciós helyen Val, Gln, Asp, Gly, Ile, Ala, Met vagy Val, előnyösebben Val vagy Ala aminosav található; vagy amelyekben az Xaa¹⁷ szubsztitúciós helyen His, Glu, Pro, Ala, Lys vagy Val, előnyösebben Glu vagy Pro aminosav található; vagy amelyekben az Xaa¹⁸ szubsztitúciós helyen Val, Thr, Asp, Pro, Arg, Tyr, Ala vagy Lys, előnyösebben Thr aminosav található; vagy amelyekben az Xaa¹⁹ szubsztitúciós helyen Arg, Pro, Ile, Leu vagy Thr, előnyösebben Pro aminosav található; vagy amelyekben az Xaa²⁰ szubsztitúciós helyen Arg, Lys, Gln vagy Ser, előnyösebben Arg vagy Lys aminosav található; vagy amelyekben az Xaa²¹ szubsztitúciós helyen Ala,

Asp, Thr vagy Gly, előnyösebben Ala aminosav található; vagy amelyekben az Xaa²² szubsztitúciós helyen Ser, Ile, Tyr, Asn, Leu, Val, Arg vagy Phe, előnyösebben Ser vagy Arg aminosav található; vagy amelyekben az Xaa²³ szubsztitúciós helyen Met, Phe, Ile, Glu, Leu, Thr vagy Val, előnyösebben Phe vagy Ile aminosav található; vagy amelyekben az Xaa²⁴ szubsztitúciós helyen Pro, Lys, Thr, Asn, Leu, Gln, Ser vagy Ile, előnyösebben Pro vagy Ile aminosav található; vagy amelyekben az Xaa²⁵ szubsztitúciós helyen Arg, Lys vagy Leu, előnyösebben Arg aminosav található; vagy amelyekben az Xaa²⁶ szubsztitúciós helyen Val, Ile, Lys, Leu, Ala, Pro, Phe, Gln, Trp vagy Thr, előnyösebben Val vagy Ile aminosav található; vagy amelyekben az Xaa²⁷ szubsztitúciós helyen Gly, Ser vagy Thr, előnyösebben Gly aminosav található; vagy amelyekben az Xaa²⁸ szubsztitúciós helyen Asp, Arg, Glu, Leu, Gly vagy Gln, előnyösebben Arg aminosav található; vagy amelyekben az Xaa²⁹ szubsztitúciós helyen Gly vagy Ala aminosav található; vagy amelyekben az Xaa³⁰ szubsztitúciós helyen Asn vagy Lys aminosav található; vagy amelyekben az Xaa³¹ szubsztitúciós helyen Gly, Asp, Leu, Arg, Glu, Thr, Tyr, Val vagy Lys, előnyösebben Arg vagy Lys aminosav található; vagy amelyekben az Xaa³² szubsztitúciós helyen Val, Gln, Asp, Gly, Ile, Ala, Met vagy Thr, előnyösebben Gln vagy Ala aminosav található.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz csatolt ábrákat.

A találmány szerinti megoldás lényege még világosabb lesz az alábbi részletes leírás, az azt követő igénypontok, valamint a csatolt ábrák alapján.

Az 1. ábrán az EST R35464 (12. azonosító számú szekvencia) nukleotidszekvenciát, valamint a fenti DNS-szekvencia alapján transzlátált aminosavszekvenciát (13. azonosító számú szekvencia) ábrázoltuk, amely az aprotininnel bizonyos mértékű szekvenciahasonlóságot mutató nyitott leolvasási keretet eredményezett. A transzlációs termék a Kunitz-szerű gátlódoménekre jellemző 6 ciszteinből ötöt tartalmazott, egymástól megfelelő távolságban (vastagon szedve). A hiányzó cisztein által normális esetben elfoglalt pozícióban (a 38. kodonnál) fenil-alanin található (csillaggal jelölve).

A 2. ábrán az EST R74593 (14. azonosító számú szekvencia) nukleotidszekvenciáját, valamint a fenti DNS-szekvencia transzlációja által eredményezett aminosavszekvenciát ábrázoltuk (15. azonosító számú szekvencia), amely a Kunitz-osztályba tartozó szerinproteáz-gátló doménnel homológiát mutató nyitott leolvasási keretet eredményezett. A transzlációs termék a Kunitz-szerű gátlódoménokra jellemző 6 ciszteinből ötöt tartalmaz, egymástól megfelelő távolságban (vastagon szedve). Ez a leolvasási fázis azonban stopkódot tartalmaz a 3. és 23. kodonoknak megfelelően.

A 3. ábrán humán, placenta-bikunin „konszenzus”-ként jelölt, következtetett nukleinsavszekvenciáját (9. azonosító számú szekvencia) ábrázoltuk, amelyet összevetettünk a transzlátálódott protein, „transzlátálódott” szekvenciaként jelölt aminosavszekvenciájával (10. azonosító számú szekvencia). Az ábrán összehasonlításképp bemutatjuk az EST H94519 (16. azonosító

tó számú szekvencia), EST N39798 (17. azonosító számú szekvencia), EST R74593 (14. azonosító számú szekvencia) és EST R35464 (12. azonosító számú szekvencia) nukleinsavszekvenciáját. A konszenzus-szekvenciában aláhúzással jelölt nukleotidok megfelelnek a példákban ismertetett PCR láncindító oligonukleotidok helyének. A transzlatálódott konszenzusszekvenciában az aláhúzott aminosavak olyan aminosavakat jelölnek, amelyek azonosságát tisztított, natív, humán placenta-bikunin aminosavszekvenálásával megerősítettük. Nukleotid- és aminosavkódként standard egybetűs kódokat alkalmaztunk, a nukleinsavkódban „N”-nel jelöltük a nem azonosított nukleinsavakat, és az aminosavszekvenciában „*”-gal jelöltük a stopkodot.

A 4A. ábrán a humán placenta-bikunint vagy annak fragmenseit kódoló EST-szekvenciákkal bizonyos mértékű homológiát mutató EST-szekvenciák sorozatának átfedéseit ábrázoltuk. Referenciaként ábrázoltuk a bikunin (7–64.)- és bikunin (102–159.)-fragmensek egymáshoz viszonyított helyzetét, amelyeket az ábrán KID1-ként és KID2-ként jelöltünk.

A 4B. ábrán ezt követő, még részletesebb, további EST-szekvenciákra is kiterjedő EST-átfedés-analízist ábrázoltunk. Az ábra felső részén található X tengelyen feltüntetett számok bázispárban kifejezett méretet jelentenek, az 5'-irányban található legszélső EST-szekvencia első bázisától számítva. Az egyes fekvő oszlopok hossza arányos az adott EST-szekvenciákat felépítő bázisok számával, a hézagokat („gaps”) is beleértve. Az EST nyilvántartási számot az adott EST-szekvenciának megfelelő fekvő oszloptól jobbra tüntetjük fel.

A 4C. ábrán az előző, 4B. ábrán vázlatosan feltüntetett, átfedő EST-szekvenciák oligonukleotidszekvenciáinak összevetését ábrázoljuk. A legfelső, bikunin elnevezéssel jelölt szekvencia (51. azonosító számú szekvencia) képviseli azt a konszenzus-oligonukleotidszekvenciát, amelyet az egyes pozíciókban előforduló átfedő nukleotidok alapján határoztunk meg. A számozás az EST-szekvenciaterkép bázispár-pozícióinak felel meg. Az EST R74593 szekvencia azon oligonukleotidjai, amelyeket vastagon aláhúztunk (a 994. és 1005. térképpozícióban), az R74593-szekvenciában megfigyelt bázisinszerciókat jelölnék, amelyek következtében hiányoznak a többi átfedő EST-szekvenciából.

A 4D. ábrán az előző, 4C. ábrán szereplő bikunin konszenzus-oligonukleotidszekvencia aminosavtranszlációját ábrázoltuk (45. azonosító számú szekvencia).

A 4E. ábrán placenta-bikunint kódoló szekvencia nukleotidszekvenciáját (46. azonosító számú szekvencia) és megfelelő aminosavtranszlációját (47. azonosító számú szekvencia) ábrázoltuk, amely szekvenciát humán placentaeredetű cDNS-könyvtárból izoláltunk, PCR-amplifikációs eljárással.

A 4F. ábrán natív, humán placenta-bikunint kódoló klón nukleotidszekvenciáját (48. azonosító számú szekvencia) és megfelelő aminosavtranszlációját (49. azonosító számú szekvencia) ábrázoltuk, amely klónt humán placentaeredetű lambda-cDNS-könyvtárból izoláltunk, telephibridizációs eljárással.

A 4G. ábrán összehasonlítottuk a placenta-bikunin EST-átfedés-analízissel (45. azonosító számú szekvencia), PCR-klónozással (47. azonosító számú szekvencia) és hagyományos lambda-telephibridizációval (49. azonosító számú szekvencia) kapott, aminosavvá transzlatált oligonukleotidszekvenciák egyeztetetőségének mértékét.

Az 5. ábrán humán placenta-bikunin placentaszövetből történt tisztításának elúciós görbét ábrázoltuk, Superdex-75-oszlopon végzett gélszűrést követően. Az ábrán egymásra helyeztük a 280 nm hullámhosszon, fajlagos fényelnyeléssel (OD) meghatározott protein elúciós profil görbét (folyamatos vonal), az eluált protein tripszininhibitor-aktivitását mutató görbét (a %-ban kifejezett gátlási értékeket körökkel jelöltük) és az eluált protein kallikreininhibitor-aktivitását mutató görbét (a %-ban kifejezett gátlási értékeket négyzetekkel jelöltük).

A 6. ábrán humán placenta-bikunin placentaszövetből, C18-oszlopon végzett reverz fázisú kromatográfiás eljárás szerint történő tisztításának elúciós görbét ábrázoltuk. Az ábrán egymásra helyeztük az optikai sűrűség (OD) mérésével, 215 nm hullámhosszon meghatározott protein elúciós profil görbét (folyamatos vonal), az eluált protein tripszininhibitor-aktivitását mutató görbét (a %-ban kifejezett gátlási értékeket körökkel jelöltük) és az eluált protein kallikreininhibitor-aktivitását mutató görbét (a %-ban kifejezett gátlási értékeket négyzetekkel jelöltük).

A 7. ábrán ezüstfestéssel előhívott SDS-PAGE-gél látható, amelyen nagy tisztaságú placenta-bikunint (2. sáv) és a kilodaltonban megadott molekulatömegű markerproteinek sorozatát futtattuk (1. sáv). A vándorlás felülről lefelé történt.

A 8. ábrán az SC101- (8A. ábra) és WHL341- (8B. ábra) élesztőtörzsek tenyésztése során nyert, sejtmentes fermentációs tápfolyadék tripszingátló aktivitásának mértékét ábrázoltuk. Mindkét élesztőtörzset stabilan transzformáltuk placenta-bikunin (102–159.)-fragmensének expresszáldását irányító pS604-plazmiddal.

A 9. ábra SC101-élesztőtörzsek (2.4 és 2.5 jelzésű rekombinánsok) tenyésztése során nyert, sejtmentes fermentációs tápfolyadék ezüsttel festett SDS-PAGE (bal oldali ábrarészlet) vizsgálatának, valamint placenta-bikunin (102–159.)-fragmenssel szemben előállított poliklonális ellenanyaggal végzett Western-blot-vizsgálatának (jobb oldali ábrarészlet) eredményét mutatja. Az SC101-élesztőtörzset stabilan transzformáltuk, szarvasmarha-aprotinin vagy humán placenta-bikunin (102–159.)-fragmens expresszióját irányító plazmiddal. A vándorlás felülről lefelé történt.

A 10. ábra egy fénykép, amely nagy tisztaságú, placenta-bikunin (102–159.)-fragmens (2. sáv) és kilodaltonban megadott molekulatömeg-markerek sorozatának (1. sáv) ezüsttel festett SDS-PAGE vizsgálatának az eredményét mutatja. A vándorlás felülről lefelé történt.

A 11. ábrán egy fénykép látható, amely különböző humán szövetekből származó mRNS-ek Northern-blot-vizsgálatának eredményét mutatja. A különböző mRNS-eket ³²P-izotóppal jelölt, placenta-bikunin (102–159.)-fragmenst (11A. ábrarészlet) vagy placenta-bikunin

(1–213.)-proteint (11B. ábrarészlet) kódoló cDNS-próbával hibridizáltattuk. A vándorlás felülről lefelé történt. Az egyes lenyomatoktól balra feltüntetett számok a megfelelő RNS-markerek kilobázisban megadott méretét jelölik. A szövet, amelyből az adott mRNS-t nyertük, a lenyomat egyes sávjai alatt jelöltük.

A 12. ábra immunoblotvizsgálat eredményét mutatja. Placentaeredetű bikunint reagáltattunk szintetikus, redukált, placenta-bikunin (7–64.)-fragmenssel (12A. ábrarészlet) vagy bikunin (102–159.)-fragmenssel (12B. ábrarészlet) szemben nyúlban termelt ellenanyaggal. Mindkét gélen a következő mintákat futtatuk: molekulatömeg-markerek (1. sáv); humán placenta-bikunin (2. sáv); szintetikus placenta-bikunin (7–64.)-fragmens (3. sáv); szintetikus placenta-bikunin (102–159.)-fragmens (4. sáv). A tricint tartalmazó, 10–20%-os SDS-PAGE gradiensgélekről lenyomatot készítettünk, amelyet protein A-oszlopon tisztított poliklonális első ellenanyaggal (8 µg IgG, 20 ml, 0,1% szarvasmarha-szérumalbumint tartalmazó Tris-pufferolt fiziológiás konyhasóoldatban, pH=7,5), majd alkalikus foszfatázzal konjugált, kecskében termelt antinyúl második ellenanyaggal hívtunk elő. A vándoroltatás főnről lefelé történt.

A 13. ábrán „Coomassie Blue” reagenssel festett, tricint tartalmazó 10–20%-os SDS-PAGE-gélen futtatott, 3 mikrogramm mennyiségű, nagy tisztaságú placenta-bikunin (1–170.)-protein látható, amelyet bakulovírus/Sf9 expressziós rendszerben állítottunk elő (2. sáv). Az 1. sáv molekulatömeg-markereket tartalmaz. A vándoroltatás felülről lefelé történt.

A 14. ábrán Sf9-eredetű humán placenta-bikunin (1–170.) (tele körök), szintetikus placenta-bikunin (102–159.) (üres körök) és aprotinin (üres négyzetek) emelkedő koncentrációinak, humán plazma aktivált parciális tromboplasztin idejére kifejtett hatását hasonlítottuk össze. Az alvadást CaCl₂ hozzáadásával indítottuk meg. A proteinek koncentrációját egy viszonyszámmal szemben ábrázoltuk, amely azt fejezi ki, hogy adott protein adott koncentrációban hányszorosára nyújtotta az alvadási időt. A gátlás nélküli alvadási idő 30,8 másodperc volt.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány szerinti megoldást.

A találmány tárgyát képezi egy újonnan azonosított humán protein, amelyet leírásunkban humán, placenta-bikuninproteinnak nevezünk, és amely protein két, Kunitz-osztályba tartozó szerinproteáz-gátló domént tartalmaz. A találmány tárgyát képezik továbbá placenta-bikunint, vagy annak fragmenseit tartalmazó gyógyászati készítmények, amelyek alkalmasak műtét előtti, alatti és utáni vérvesztés csökkentésére, sebészeti beavatkozásnak kitett vagy súlyosan sérült egyéneknél.

A találmány tárgyát képezik továbbá eljárások, amelyek alkalmasak műtét előtti, alatti és utáni vérvesztés csökkentésére, sebészeti beavatkozásnak kitett vagy súlyosan sérült egyénben, amelyek szerint az egyénnek a találmány szerinti humán szerinproteáz-gátló proteinek hatékony mennyiségét adjuk be, biológiailag elfogadott vivőanyagban adjuk be.

A placenta-bikuninprotein, annak izolált doménjai és más variánsai előnyösen alkalmazhatók vérvesztés mérséklésére, sérülés vagy sebészeti beavatkozás esetén, amikor fennáll a valószínűsége nagy mennyiségű vér elvesztésének. Ezek a készítmények mérséklék vagy feleslegessé teszik a teljes donor vér vagy vérkészítmények iránti igényt, ezáltal csökkentik fertőzések vagy más káros mellékhatások kialakulásának kockázatát, valamint a sebészeti beavatkozás költségeit. Ezek az eljárások alkalmasak tehát vérvesztés mérséklésére normálegyénekben, azaz olyanokban, akik nem szenvednek veleszületett vagy az operációt megelőzően szerzett, koagulációs faktorokat érintő rendellenességben. A csökkent vérvesztés a sebészeti beavatkozás alatti vérvesztés mérséklődésében, vagy az operáció utáni drenálással veszített vér csökkenésében vagy mindkettőben nyilvánul meg. A találmány szerinti proteinek előnyösen alkalmazhatók például – de anélkül, hogy igényünket az alábbiakra korlátoznánk – a következő sebészeti beavatkozások kapcsán: mellkasi és hasi műtétek, teljes vagy részleges csípőprotézis-műtétek, vagy a szem epitheliális sérülésének kezelésére végzett műtétek. Azok előnyösen alkalmazhatók például – de anélkül, hogy igényünket az alábbiakra korlátoznánk – az alábbi mellkasi műtétek során: aortakoszorúér „bypass” műtét, szív- és aortaaneurizmák kimetszése, nyelőcsővarixok műtéti kezelése vagy koszorúér „bypass” műtétek. Ilyen proteinek előnyösen alkalmazhatók például – de anélkül, hogy igényünket az alábbiakra korlátoznánk – az alábbi hasi műtétek kapcsán: májtranszplantáció, radikális prosztataeltávolítás, vastagbél-divertikulitisz műtétje, tumorok eltávolítása, hasi aorta műtétje és duodenális fekélyek műtétje, valamint máj- vagy lépsérülés sebészeti ellátása. A találmány szerinti proteinek előnyösen alkalmazhatók például – de anélkül, hogy igényünket az alábbiakra korlátoznánk – az alábbi baleseti sérülések ellátásánál: súlyosan sérült egyének stabilizálása a baleset helyszínén, például végtag elvesztése, súlyos mellkasi vagy hasi sérülés után. Amennyiben placenta-bikunint, annak izolált doménját vagy más variánsát sebészeti beavatkozás okozta vérvesztés csökkentésére alkalmazzuk, azt előnyösen a műtét előtt és annak során adagoljuk; míg baleseti sérülés ellátásánál placenta-bikunint, annak izolált doménját vagy más variánsát előnyösen a sérülést követően minél hamarabb adjuk be, és ezekkel a készítményekkel minden, baleseti helyszínre utazó mentőjárművet el kellene látni.

A XII-faktor (más néven Hageman-Faktor) egy szerinproteáz, amely a keringésben zimogén formában (80 kD) található, körülbelül 29–40 µg/ml koncentrációban [Pixley és munkatársai: Meth. in Enz. 222, 51–64 (1993)], és az szöveti kallikreinnel vagy plazmakallikreinnel aktiválható. Aktiválódását követően részt vesz a véralvadás intrinszc reakcióútjában, amely akkor aktiválódik, ha vér vagy plazma „idegen” vagy anionos felszínnel érintkezik. Miután aktiválódott, a XIIa-faktor számos más plazmaproteázt képes hasítani és aktiválni, például a XI-faktort, prekallikreint, valamint a komplementrendszer C1-komponensét. Ennek megfelelően,

a XII-faktor részt vehet vérnyomáscsökkenést eredményező reakciókban, miután az aktivált kallikrein kininogént hasíthat, ami bradikininfelszabaduláshoz vezet [Colman: *J. Clin. Invest.* 73, 1249 (1984)].

A szepszis bakteriális fertőzés következményeképp kialakuló kórkép, amelynek tünetei bakteriális endotoxin vagy lipopoliszacharid (LPS) hatására jönnek létre. A XII-faktor és LPS érintkezése a XII-faktor aktiválódását eredményezi. Szepszisben szenvedő egyéneknél gyakran jelentkezik az intravaszkuláris koaguláció (vér-
5 edényen belüli alvadás) tünetegyüttese, amelyet szintén a XII-faktor LPS által történt aktiválódása magyarázhat. Szeptikus sokk, bakteriális fertőzés következményeként alakulhat ki, és lázzal, alacsony vaszkuláris rezisztenciával, valamint alacsony artériás vérnyomással jár. Az említett kórkép az Egyesült Államokban, az intenzív osztályokon gyakori halálok, ahol a szeptikus sokkban elhalálozó ápoltak hetvenöt százalékánál tartósan alacsony vérnyomás mérhető [Parillo és munkatársai: *Ann. Rev. Med.* 40, 469–485 (1989)].

A felnőttkori légzőszervi elégtelenség szindróma („adult respiratory distress syndrome”, ARDS) tüdőödéma, hypoxémia és csökkent tüdőteljesítmény jellemzi. A betegség patogenezeise még nem ismert, bár valószínű, hogy kialakulásában szerepet játszanak a koaguláció és fibrinolízis proteolitikus reakcióútjai [Carvalho és munkatársai: *J. Lab. Clin. Med.* 112, 270–277 (1988)].

A találmány szerinti proteinek új, szintén Kunitz típusú gátlói a kallikreinnek, a XII-faktor aktivátorának. Ennek megfelelően, a találmány tárgyát képezik eljárások olyan szisztémás gyulladáshoz vezető megelőző vagy terápiás kezelésére, mint például a szeptikus sokk, felnőttkori légzési elégtelenség szindróma (ARDS), preeklampszia, több szervre kiterjedő működéselégelenség és disszeminált intravaszkuláris koaguláció (DIC). A találmány szerinti peptidok terápiás vagy megelőző célzatú alkalmazása befolyásolhatja ezen gyulladáshoz vezető állapotokat, és jótékony hatással lehet a kezelt egyénre.

A plazmin fontos szerepet játszik a sejten kívüli mátrix lebontásában és a mátrixmetalloproteáz (MMP)-kaskádok aktiválásában. Együttesen, ezen proteázok közvetítésével valósul meg az endothelsejtek migrációja és szöveti inváziója az angiogenezis és neovaszkularizáció során, valamint a ráksejtek migrációja és szöveti inváziója az áttétképződés során.

A neovaszkularizáció elengedhetetlen tumorok növekedéséhez, és az áttétképződés az a folyamat, amely biztosítja a tumorok terjedését, ami viszont nagyon rossz prognózist jelent a beteg számára.

Számos klinikai előtanulmány utal arra, hogy az aprotininhez hasonló proteázspecifitással rendelkező Kunitz-szerű szerinproteáz-gátlók alkalmazhatók rákellenes gyógyszerekként. Például az aprotinin, fokozott tumornekrozis mellett, mérsékelte a tumor növekedését és invázióját, amennyiben azt erősen invazív fibroszarkómát hordozó hörcsögökbe, vagy hasonlóan malignus emlőkarcinómát hordozó egerekbe adták [Latner és munkatársai: *Br. J. Cancer* 30, 60–67 (1974); Latner és Turner: *Br. J. Cancer* 33, 535–538 (1976)]. Ezenfelül

Lewis tüdőkarcinóma-sejtek befecskendezését követő 1–14. napon ip. beadott 200 000 KIU mennyiségű aprotinin, C57B1/6 Cr hím egerekben 50%-kal csökkentette a tüdőmetasztázisok előfordulásának gyakoriságát, ugyanakkor nem befolyásolta a primer tumor tömegét [Giraldi és munkatársai: *Eur. J. Cancer* 13, 1321–1323 (1977)]. Hasonlóképp, Lewis karcinómasejtek injektálását követően, a 13. és 16. napon beadott 10 000 KIU aprotinin, C57/6J egerekben 90%-kal csökkentette a tüdőmetasztázisok előfordulását anélkül, hogy hatása lett volna a primer tumor növekedésére [Uetsuji és munkatársai: *Jpn. J. Surg.* 22, 429–442 (1992)]. Ugyanezen szakirodalmi hely szerint plazmin vagy kallikrein azonos adagban történő beadása növelni lát-
10 szott a tüdőmetasztázisok számát. Ezek az eredmények arra a feltételezésre készítették a szerzőket, hogy aprotinin perioperatív alkalmazása rákbetegeknél csökkentheti a metasztázisok kialakulásának valószínűségét. Black és Steger [Eur. J. Pharmacol. 38, 313–319 (1976)] azt tapasztalták, hogy az aprotinin gátolta a transzplantált, rágszálóeredetű Murphy-Strum limfoszarkóma növekedését patkányokban, és feltételezték, hogy e hatásban szerepet játszik a kininképző enzimrendszer gátlása. Egyetlen, 3-metilolantrén-kezeléssel kiváltott, helyben képződött pikkelysejtes karcinómát hordozó nőstény ddY-egerek napi kétszeri injektálása 10 000 KIU aprotininnal, hét héten át, 90%-kal csökkentette a primer tumorok növekedését. Néhány állatban a tumor visszafejlődését tapasztalták. Míg a csak hordozóanyaggal kezelt állatok hét héten belül elhullottak, az aprotininnal kezelt csoport életben maradt. A csökkent tumornövekedés hiperkeratózissal volt összefüggésben [Ohkoshi: *Gann* 71, 246–250 (1980)].

Sebészeti eljárással kezelt, 26 betegből álló csoport, amely iv. aprotinint kapott, klinikailag 70% túlélést mutatott két évvel a sebészeti beavatkozás után, a tumorok kiújulása nélkül, ugyanakkor a szintén 26 betegből álló placebo csoportban mindössze 38% túlélést és jelentős számú tumorkiújulást tapasztaltak [Freeman és munkatársai: *Br. Soc. Gastroenterol. suppl. A*, 902 (1980)]. Egy esettanulmány szerint [Guthrie és munkatársai: *J. Clin. Pract.* 35, 330–332 (1981)] bromokriptin és aprotinin adagolása remissziót eredményezett előrehaladott méhnyakrákban szenvedő betegekben. Az aprotinint egyrészt, minden nyolcadik órában, 500 000 KIU-t tartalmazó ip. labdacs, másrészt folyamatos iv. infúzió formájában (200 000 KIU, hat óra alatt) adagolták, összesen hét napon át, havonta egyszer. A negyedik hónap végén a kezelést aprotininnal szembeni allergiás reakció kialakulása miatt abba kellett hagyni. Újabb bizonyítékok még jobban kihangsúlyozzák a plazmin mint célmolekula szerepét az aprotinin metasztázisokra kifejtett fenti hatásaiban.

Ezen történések mechanizmusa arra a tényre vezethető vissza, hogy az aprotinin gátolja ráksejtvonalak invazív képességét [Liu G. és munkatársai: *Int. J. Cancer* 60, 501–506 (1995)]. Továbbá, mivel a találmány szerinti proteinek szintén hatékonyan gátolják a plazmin és kallikreint, azok alkalmazhatók rákellenes szerekként. Azok alkalmazhatók például primer tumor nö-

vekedésének megakadályozására, amikor is neovaszkularizációt gátló tulajdonságukat használjuk ki; primer tumor inváziójának gátlására; valamint szöveti infiltrációt gátló tulajdonságuk miatt, metasztázisok kialakulásának megakadályozására. A proteinek alkalmazhatók a tumor helyén lokálisan vagy szisztémásan. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a proteinek a tumoreltávolítás során, a perioperatív időszakban adjuk be, hogy csökkentsük az áttétképződés kockázatát. Az alkalmazás időpontjának ilyen megválasztásával a proteinek vérmegtakarító tulajdonsága azzal a további előnnyel jár, hogy tisztább sebészeti látóteret biztosítanak a műtét alatt. A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint a proteinek kombinációs terápiában alkalmazhatjuk, MMP-gátlókkal vagy kemoterápiával együtt. Alkalmazhatunk továbbá lokális génterápiát, amelyet úgy tervezünk meg, hogy a placenta-bikunin szelektív módon a tumorsejtekben belül, vagy csatlakozó kötőszövetes és vaszkuláris fészkekben expresszálódjon.

A találmány szerinti terápiával megcélzott előnyös ráktípusok a vaszkularizálódásfüggő szolid tumorok, például emlő-, vastagbél-, tüdő-, prosztata- és petefészek-karcinómák, amelyek erős áttétképzési potenciállal rendelkeznek, és amelyek esetében a proteinek nagy koncentrációban történő lokális bevitele megoldható, például tüdőrák esetén tüdőn át, vastagbél-karcinómák esetén májon át történő beadás a májártétekhez, vagy bőrrákok esetén, például fej- és nyakkarcinómák esetén szubkután beadás. Mivel a találmány szerinti proteinek humán eredetűek, sokkal kevésbé valószínű, hogy azok ismételt alkalmazása esetén olyan allergiás vagy anafilaxiás reakciókat váltanak ki, amelyet például Guthrie és munkatársai (lásd fentebb) figyeltek meg.

Továbbá a találmány szerinti proteinek alkalmazhatók a vérárvadás intrinszc reakcióútjának aktiválódásával összefüggő tromboembóliás komplikációk csökkentésére. Alkalmazhatók például késői stádiumú rákbetegekben tüdőembólia megelőzésére, amely ilyen esetekben a halál gyakori oka [Donati M. B.: Haemostasis 24, 128–131 (1994)].

Az agy és a gerincvelő ödémája olyan komplikáció, amelyet okozhat traumás agy- és gerincvelő-sérülés, agyvérzés (apoplexia), cerebrális ischaemia, cerebrális és szubarachnoidális vérömleny, sebészeti beavatkozás (például nyitott szívűműtét), fertőző betegségek (például agyvelőgyulladás és agyhártyagyulladás), granulomatózus betegségek (például Szarkoid és fokális vagy diffúz karcinómák), és amely hozzájárul ilyen események után megfigyelhető megbetegedések és halálesetek gyakori előfordulásához. A bradikininről ismert, hogy kísérleti körülmények mellett átjárhatóvá teszi a vér-agy gátat [Greenwood J.: *Neuroradiology* 33, 95–100 (1991); Whittle és munkatársai: *Acta Neurochir.* 115, 53–59 (1992)], és bradikinin infundálása a belső nyaki verőérbe agyödémát vált ki, spontán hipertenzív patkányokban (SHR), amelyekben közös nyaki-erő-er-elzáródást hoztak létre [Kamiya: *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 57, 180–191 (1990)]. Emelkedett bradikinin szintet találtak traumát követően, az extracellu-

lárís folyadékokban, traumatizált patkány gerincvelő modellben [Xu és munkatársai: *J. Neurochem.* 57, 975–980 (1991)] és cerebrális ischaemia okozta agyi ödémának kitétt patkányok plazmájában és szöveteiben [Kamiya és munkatársai: *Stroke* 24, 571–575 (1993)]. Bradikinin szabadítanak fel a szerinproteázok, például kallikrein, a nagy molekulatömegű kininogénmolekulából [Coleman: *J. Clin. Invest.* 73, 1249 (1993)], és a szerinproteáz-gátló aprotininről megállapították, hogy mérsékli a cerebrális ischaemia okozta agyödéma mértékét SHR patkányokban [Kamiya: *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 57, 180–191 (1990); Kamiya és munkatársai: *Stroke* 24, 571–575 (1993)], és csökkenti az agyödéma mértékét hideg agyi lézióknak kitétt nyulakban [Unterberg és munkatársai: *J. Neurosurgery* 64, 269–276 (1986)].

Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az agyödémát az váltja ki, hogy lokális proteolitikus reakciók során nagy molekulatömegű kininogénmolekulából kininek, például bradikinin szabadul fel, majd a bradikinin a vér-agy gát permeabilitásának fokozódását eredményezi. Ennek megfelelően, a placentaeredetű bikunin és annak fragmensei alkalmazhatók gyógyászati készítményként, ödéma megelőzésére, az ilyen körkép kockázatának kitétt egyéneknél, különösen olyanokban, akik agysérülést szenvedtek vagy életveszélyben vannak. Idetartoznak a fej- és gerinc-sérülést szenvedett egyének; a többszörös baleseti sérült (politraumatiszt) egyének; agy vagy gerinc, valamint a hozzájuk tartozó véredények műtétje előtt álló egyének; vagy olyan egyének, akiken más nagy műtétet, például nyitott szívűműtét végeznek; agyvérzést szenvedett, cerebrális vagy szubarachnoidális vérömlenyben, fertőző agybetegségben, granulomatózus agybetegségben, az agyat érintő diffúz vagy göccos karcinómában vagy tumorban szenvedő egyének; vagy bármely olyan állapotban, például sclerosis multiplexben szenvedő egyének (amely betegség a vér-agy gát károsodásával jár); vagy az agyat vagy gerincvelőt érintő gyulladásos folyamatokban szenvedő egyének. Az egyéneknek beadhatunk placentaeredetű bikunint infúzió vagy „bolus”-injekció formájában, intravénásan vagy intrakraniálisan. További placentaeredetű bikuninadagokat adhatunk be megszakításokkal, az első adagot követő, egytől három hétig terjedő időszakban. Az alkalmazott adagokat úgy választjuk meg, hogy feleslegben lévő keringő koncentrációt érjünk el ahhoz képest, mint ami a szerinproteázok hatására keletkezett bradikinin és egyéb vazoaktív peptidok plazmaszint-emelkedésének neutralizálásához szükséges, és az alkalmazott dózis elegendő legyen az ödéma csökkentésére. Mivel a protein humán eredetű, annak ismételt adagolása a terápia során nem vezet a proteinnel szembeni immunválasz kialakulásához. Placenta-bikunint és annak fragmenseit alkalmazhatjuk monoterápia során, vagy megelőző célzattal; vagy más gyógyszerekkel, például idegrendszerre ható terápiás vagy protektív hatású gyógyszerekkel kombinálva.

Egy nemrégiben megjelent közlemény szerint [Dela Cadena R. A. és munkatársai: *FASEB* 9, 446 (1995)] a

kontaktaktivációs út szerepet játszhat artritiszek és anémiák kóroktanában, és ilyen esetekben kallikrein-inhibitorok előnyösen alkalmazhatók terápiás célra. Következésképp, figyelembe véve a találmány szerinti proteázinhibitorok humán kallikreint gátló képességét, felmerül azok gyógyszerként történő alkalmazásának lehetősége emberben, artritisz és anémia kezelésére. Nem inzulinfüggő diabéteszes férfibetegek (NIDDM) kezelése aprotininnal jelentősen javította azok összcsukorfevéletét, és csökkentette az inzulin metabolikus úton történő lebontásának sebességét [Laurenti és munkatársai: *Diabetic Medicine* 13, 642 (1996)]. A fentiek szerint a találmány szerinti humán proteinek tartósan alkalmazhatók gyógyszerként, NIDDM-betegek kezelésére.

Olyan betegek napi kezelése, két héten át, vizelet-eredetű tripszinhibitorral, akiknél koraszülés kockázata állt fenn, szignifikánsan csökkentette a visszatérő méhösszehúzódások gyakoriságát [Knayama és munkatársai: *Eur. J. Obstet. Gynecol. & Reprod. Biol.* 67, 133 (1996)]. Ebből következően a találmány szerinti humán proteinek alkalmazhatók koraszülés megelőzésére.

Az aprotininről kimutatták, hogy tenyészetben stimulálja az egér mioblastok differenciálódását [Wells és Strickland: *Development* 120, 3639 (1994)], amely folyamatot a TGF β gátol. A TGF β inaktív propolipeptidként fordul elő, amely korlátozott proteolízis révén kerül aktivált állapotba. Az aprotinin feltételezetten a pro-TGF β -t érett, aktív formává alakító proteázok gátlásán keresztül fejti ki hatását. A TGF β -ről leírták, hogy különböző fibrotikus károsodásokban fokozottan aktivált állapotban van, és régóta úgy tekintik, mint antifibrotikus terápiás eljárások potenciális célpontját. Például tüdőfibrozis patkány modellben a TGF β -koncentrációk párhuzamosan alakultak a bleomycin kiváltotta gyulladás mértékével. Továbbá az alveoláris makrofágokban mérhető plazminszintek összefüggést mutattak az érett TGF β -protein-szintekkel, és a-2-antiplazmin elnevezésű plazmininhibitor hozzáadása meggátolta a pro-TGF β makrofágok általi posztranszlációs aktivációját [Khal és munkatársai: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15, 252 (1996)]. A fenti eredmények szerint a plazmin hozzájárul az alveoláris makrofágok közreműködésével képződő aktív TGF β mennyiségének növekedéséhez, és ez a folyamat kóros szerepet játszik a bleomycin kiváltotta tüdőinflammációban (gyulladásban).

A fenti megfigyelések szerint a placenta-bikunin és fragmensei alkalmazhatók terápiás hatóanyagokként, különböző fibrotikus rendellenességek, például tüdő-, máj-, vese- és bőr- (szkleroderma) fibrózisok kezelésére.

Porlasztott aprotininről kimutatták, hogy influenza-vírus vagy paramyxovírus letális dóziséval fertőzött egerek több mint 50%-át megvédte a pusztulástól [Ovcharenko és Zhirnov: *Antiviral Research* 23, 107 (1994)]. A porlasztott aprotininnal végzett kezelés ugyancsak mérsékelte az egyébként fatális vérzéses bronchopneumonia súlyosságát, és normalizálta a testtömeg-gyarapodást. A fenti megfigyelések fényében a placenta-bikunin és annak fragmensei alkalmaz-

hatók terápiás hatóanyagokként, különböző légúti eredetű influenzaszerű megbetegedésekben.

A humán placenta-bikunin, annak izolált doménjai és annak egyéb találmány szerinti variánsai alkalmazhatók a natív aprotinin vagy más gátlóprofillal jellemezhető aprotininanalógok esetében ajánlott orvosi/terápiás célokra, különösen olyan esetekben, amikor nagy dózisos alkalmazása javallt. Ilyen betegségek/állapotok, amelyekben a humán proteinek humán szerinproteáz-gátló aktivitását, például tripszin, plazmin, kallikrein, elasztáz, katepszin-G vagy proteináz-3 gátló aktivitását használjuk ki, például, de anélkül, hogy igényünket az alábbiakra korlátoznánk, a következők: akut hasnyálmirigy-gyulladás (pancreatitis) (hasnyálmirigy-elasztáz és -tripszin gátlására), gyulladások, trombocitopénia, vérlemezke-funkció fenntartása, szervek épségének megőrzése, sebgyógyulás, a sokk különböző formái, például sokkos tüdő, endotoxinsokk, vagy műtétet követően jelentkező komplikációk; véralvadási rendellenességek, például hiperfibrinolitikus haemorrhagia; akut vagy krónikus gyulladással járó reakciók, elsősorban szervkárosodások kezelésére vagy megelőzésére, például hasnyálmirigy-gyulladásban vagy besugárzás kiváltotta bélgyulladásban; komplexek közvetítette gyulladással járó reakciók, például immunvaszkulitisz, glomerulonefritisz, és különböző típusú artritiszek; kollagenózisok, elsősorban reumatoid arthritis; anyagcseretermékek lerakódásával kapcsolatos artritiszek (például köszvény); szervek kötőszöveti alkotói elasztikus összetevőinek leépülésével járó állapotok, például atheroszklerózis (a szérumelasztáz gátlására) vagy tüdőemphysema (a neutrofil elasztáz gátlására); felnőttkori légzési elégtelenség tünetegyüttes; gyulladással járó bélbetegségek; és pszoriázis.

A legváratlanabb módon azt találtuk, hogy bikunin(7-64.)- és bikunin(102-159.)-szekvenciákat kódoló szintetikus peptidok a korrek, aktív proteázgátló bioaktivitással rendelkező háromdimenziós struktúrába képesek feltekeredni (lásd 2. és 1. példák). A feltekeredés során a fenti Bikunin-fragmensek tömege 6 tömegegységgel csökkent, annak következményeként, hogy az egyes fragmensek hat-hat ciszteaminosava között három-három, láncok közti diszulfidhíd képződött. Továbbá meglepő módon azt találtuk, hogy a bikunin(7-64.)-, bikunin(102-159.)- és bikunin(1-170.)-szekvenciákat kódoló szintetikus peptidok nagymértékben gátolják a plazmint, valamint a szöveti és plazmakallikreint (lásd a 4., 3. és 10. példákat). Nyitott szívű állatoknál a Trasylo[®] feltehetően olyan mechanizmus révén csökkenti a vérvesztést, amelyben szerepet játszik a Trasylo[®] plazmint és kallikreint gátló aktivitása. A találmány szerinti Kunitz-doménok specifikására utaló nem várt eredményeink szerint a találmány szerinti proteinek alkalmazhatók terápiás hatóanyagokként, jelentős vérvesztéssel járó sebészeti beavatkozások vagy trauma kapcsán, a vérvesztés csökkentésére vagy bármely olyan állapotban, amikor a plazmin és/vagy kallikrein gátlása előnyös.

Továbbá azt találtuk (lásd 10. példa), hogy a placenta-bikunin(1-170.) hatékonyan gátolja a XIa-fak-

tort, és kisebb mértékben gátolja a Xa-faktort. A XIa-faktor kulcsszerepet tölt be a véralvadás (koaguláció) intrinsic útjának szabályozásában, annak révén, hogy az inaktív IX.-faktort aktív IXa-faktorrá alakítja. A placenta-bikunin tehát a véralvadási folyamat belső útjának két kulcsenzimét is gátolja, nevezetesen a kallikreint és a XIa-faktort. A fenti megfigyelésekkel összhangban ugyancsak kimutattuk, hogy a placenta-bikunin-(1–170.) az aktivált parciális tromboplasztinidó hatékony inhibitora, amely utóbbi az intrinsic reakcióúton keresztül végbemenő alvadási folyamat sebességének jellemző paramétere. Másrészt, kimutattuk, hogy a placenta-bikunin-(1–170.) igen gyengén gátolja a VIIa-komplex szöveti faktort, ami arra utal, hogy az nem játszik lényeges szerepet az extrinsic alvadási kaszkád szabályozásában. A fenti, nem várt eredmények alapján kimondható, hogy a placenta-bikunin alkalmazható gyógyszerként, olyan betegségek kezelésére, amelyekben az alvadási folyamat intrinsic útjának aktivációja jelentős szerepet tölt be a betegség kialakulásának mechanizmusában. Ilyen betegségek például a poszttraumás sokk és a disszeminált intravaszkuláris koaguláció.

A találmány szerinti Kunitz-doménok jelentős előnye, hogy azok humán proteinek, és kisebb pozitív töltéssel rendelkeznek, mint a Trasylo[®] (lásd 1. példa), ezáltal a protein nagy dózisainak alkalmazása esetén csökken a vesekárosodás kialakulásának veszélye. Mivel a találmány szerinti proteinek humán eredetűek, azok humán betegeknek történő adagolása nem kívánt immunológiai reakciók kialakulásának lényegesen kisebb kockázatával jár, mint a Trasylo[®] hasonló dózisainak beadása. Ezenfelül azt találtuk, hogy a bikunin-(102–159.), bikunin-(7–64.) és bikunin-(1–170.), *in vitro*, szignifikánsan hatékonyabban gátolják a plazmakallikreint, mint a Trasylo[®] (lásd 3., 4. és 10. példák). A bikunin és annak fragmensei várhatóan *in vivo* is hatékonyabban alkalmazhatók a betegek vérvesztésének csökkentésére.

A beadott szerinproteáz-gátló mennyiségének elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy az a normális értéket meghaladó plazmaszintet biztosítson. Szívkoszorúér-arteria „bypass” („coronary aortic by-pass”, CABG) műtét során és azt követően, a vérvesztés megelőzésére, a találmány szerinti proteineket Trasylo[®] helyett alkalmazhatjuk, figyelembe véve a két hatóanyag hatékonyságában kimutatható különbségeket. A Trasylo[®] alkalmazásának leírása megtalálható a „Physicians Desk Reference” (1995) kiadványban, amelyben a Trasylo[®] alkalmazásait az A-kiegészítőben sorolják fel. Röviden, hanyatt fekvő betegnek, placenta-bikunin, annak izolált doménja vagy más variánsa telítő dózisát, lassan, körülbelül 20–30 perc alatt adjuk be, az anesztézia megkezdését követően, de a szternotómiát megelőzően. Általánosságban, körülbelül 8×10^6 KIU („kallikrein inhibitory units”, kallikreingátló egység) összdózist alkalmazunk, olyan faktoroktól függően, mint a beteg testtömege és a műtėti beavatkozás hossza. Előnyösen, 1–2 millió kallikreingátló egységet (KIU) tartalmazó teljes telítődózist adunk be. A telítődózis beadását követően, infúzióban

fenntartó dózist alkalmazunk, amelyet a műtét befejezéséig és a beteg műtőből történő elszállításáig folyamatosan adagolunk. Fenntartó dózisként előnyösen óránként körülbelül 250 000–500 000 KIU-t alkalmazunk, infúzióban. A pumpa által továbbított indítóadagot a kardiopulmonáris (szív-tüdő) „bypass” keringés megindításához szükséges folyadékhoz adjuk, úgy, hogy a pumpa megindításra alkalmazott folyadék egy részét, a kardiopulmonáris „bypass” beiktatását megelőzően, azzal helyettesítjük. A pumpa által továbbított indítóadag előnyösen összesen körülbelül 1–2 millió KIU-t tartalmaz.

A találmány szerinti proteineket a technika állása szerint ismert módon formulázott gyógyászati készítményekben alkalmazhatjuk. Ilyen készítmények aktív összetevőt (összetevőket), valamint egy vagy több, gyógyászatiilag elfogadható hordozóanyagot, hígítóanyagot, töltőanyagot, kötőanyagot vagy más vivőanyagot tartalmaznak, a beadás módjától és az alkalmazott készítmény kiszerezési formájától függően. Szakember számára ismert, terápiásan inert, szervesen vagy szerves hordozóanyagok például – de anélkül, hogy igényünket az alábbiakra korlátoznánk – a következők: laktóz, kukoricakeményítő vagy annak származékai, talkum, növényi olajok, gyanták, zsírok, poliolkok, például polietilén-glikol, víz, szacharóz, alkoholok, glicerin és hasonlóak. A készítményhez adhatunk továbbá különböző tartósítószeranyagokat; emulgeáló-, diszpergáló-, ízesítő-, nedvesítőszerkeket; antioxidánsokat, edesítőszerkeket, színezőanyagokat, stabilizátorokat, sókat, puffereket és hasonlókat, a készítmény stabilitásának vagy az aktív összetevő (összetevők) biológiai hozzáférhetőségének fokozására; vagy szájon át történő adagolás esetén, azért, hogy elfogadható ízű vagy színű készítményt kapjunk. Az ilyen készítményekben alkalmazott inhibitor lehet az eredeti vegyület formájában; vagy adott esetben lehet annak gyógyászatiilag elfogadható sója. A találmány szerinti proteineket beadhatjuk egymagukban, vagy különböző kombinációkban, vagy más terápiás készítményekkel kombinálva. Az így formulázott készítményeket, az inhibitor beadásának megfelelően, úgy választjuk meg, hogy azok szakember számára ismert módon beadhatók legyenek.

Parenterális beadási módok például az intravénás (iv.), szubkután (sc.), intraperitoneális (ip.), intramuszkuláris (im.) beadási módok. A készítményt intravénásan adjuk be például akkor, ha a gyógyszer plazmacsúcskoncentrációjának akut szabályozását kívánjuk elérni. Más eljárás szerint a gyógyszert adagolhatjuk folyamatosan, kívánt sebességgel, iv. katéteren keresztül. Vivőanyagként alkalmazhatunk például steril, nem pirogén vizes oldószerkeket, például steril, injektálható minőségű vizet; steril, puffertolt oldatokat; vagy steril, fiziológiás sóoldatot. A kapott készítményt a műtétet megelőzően és/vagy annak során adjuk be a betegnek, intravénás injektálással vagy infúzióval.

Javíthatjuk a gyógyszer féléletidejét, és elősegíthetjük annak célzott eljutását fagoszómákhoz, például gyulladásszerű folyamatokban szerepet játszó neutrofil sejtekhez és makrofágokhoz, oly módon, hogy azt lipo-

szómákba építjük. A liposzómák segítségével történő célzott transzport szelektivitását tovább javíthatjuk úgy, hogy a liposzómák külső felszínéhez, a célzott szerve/szövetre, például a gasztrointesztinális (GI, gyomorbél) traktusra vagy tüdőre specifikus makromolekulákhoz kötődő ligandumokat kapcsolunk. Alkalmazhatunk továbbá im. vagy sc. raktárinjekciókat („depó”-injekciókat), a gyógyszer lebontható mikrogömbökbe (például poli-DL-laktid-koglikolidet tartalmazó mikrogömböcskékbe) történő zárásával vagy anélkül; vagy alkalmazhatunk kollagént tartalmazó, a hatóanyag védelmét szolgáló készítményeket, hogy a gyógyszer folyamatos felszabadulását hosszabb időn keresztül biztosítsuk. A készítmény adagolását megkönnyítő kiszerezési formaként alkalmazhatunk ip. beültetett tárolót (rezervoirt) és szeptumot, például a „percuseal” rendszert. A beadást megkönnyítő és a beteg igényeihez jobban alkalmazkodó megoldás injektor „tollak” alkalmazása (például a „Novo Pin” vagy „Q-pen” alkalmazása), vagy tümentes „jet”-injektorok alkalmazása (például a Bioject, Mediject vagy Becton Dickinson ilyen termékeinek alkalmazása). A készítmény pontosan szabályozott felszabadulását érhetjük el beültetett pumpák segítségével, amelyekből a gyógyszer kanülön keresztül kerül a kívánt helyre. Ilyen pumpák például az ALZA cégtől hozzáférhető, bőr alá ültetett ozmotikus pumpa, például az ALZET ozmotikus pumpa.

A gyógyszert orron át (nazálisan) beadhatjuk úgy, hogy azt bioadhezív részecskehordozóba (200 nm-nél kisebb méretű részecskékbe) építjük, például cellulózt, poliakrilátot vagy polikarbofillt, valamint megfelelő, abszorpciót fokozó komponenst, például foszfolipideket vagy akrilkarnitineket tartalmazó hordozóba építjük. Kereskedelemben hozzáférhető ilyen rendszerek például a „Dan Biosys” és a „Scios Nova” által kifejlesztett rendszerek.

A gyógyszer pulmonáris úton történő beadásával, azt nem parenterális úton juttathatjuk a keringésbe. Az alsó légutak epitheliuma, legfeljebb körülbelül 20 kDa molekulatömegű proteinek széles skálája számára nagymértékben permeábilis. A gyógyszert megfelelő hordozóanyaggal, például mannitollal, szacharózzal vagy laktózzal együtt tartalmazó, mikronméretű száraz porok eljuttathatók a disztális alveolusok felszínére, száraz porok bejuttatására alkalmas inhalátorokkal, például az Inhale™, Dura™, Fisons™ (Spinhaler™) és Glaxo (Rothaler™), vagy Astra (Turbohaler™) hajtógázalapú, dózisadagolású inhalátorok alkalmazásával. Oldatként előállított készítményeket, liposzómákkal vagy anélkül, ultrahangos nebulizerek segítségével adagolhatunk.

A gyógyszereket szájon át beadhatjuk tablettaként, védőburokkal ellátott tablettaként, drazséként, kemény- vagy lágyzselatin-kapszulákként, oldatokként, emulziókként, szuszpenziókként vagy burokkal ellátott enteroszolvens (bélben oldódó) kapszulákként, amelyeket úgy tervezünk, hogy azokból a gyógyszer a vastagbélben szabaduljon fel, ahol az emésztést eredményező proteázaktivitás alacsony. Az utóbbiak közé tartozik például az ALZA OROSC/OSMET™ rendszere,

és a „Scherer Drug Delivery Systems” PULSINCAP™ rendszere. Más rendszerek vastagbél-specifikus bakteriális azoreduktázok hatására lebomló, azokeresztkötésekkel összekapcsolt polimerek alkalmazásán alapulnak; vagy pH-szenzitív poliakrilát-polimerek alkalmazásán alapulnak, amelyek a vastagbélben uralkodó magasabb pH hatására aktiválódnak. A fenti rendszerek ismert, abszorpciót fokozó anyagok széles skálájával kombinálhatók. A gyógyszereket rektálisan (végbélen keresztül) is bejuttathatjuk, a gyógyszert kúpként kiszerezve.

A találmány egy előnyös orvosi célú alkalmazása szerint a perioperatív (műtéttel összefüggő) vérvesztés csökkentése érdekében a találmány szerinti placenta-bikunin-variánst előnyösen parenterálisan adjuk be, előnyösen iv. úton, valamely nagyéren keresztül.

A gyógyászati készítmény beadandó mennyisége függ a recipienstől és a kezelendő állapottól. A szükséges mennyiség nem elvárható mennyiségű kísérletezés nélkül meghatározható, szakember számára ismert eljárásokkal. Más eljárás szerint a szükséges mennyiség kiszámítható az állapot kezelése érdekében gátlandó célzott proteáz, például plazmin vagy kallikrein mennyisége alapján. Mivel a találmány szerinti eljárásokban alkalmazható aktív hatóanyagok nem toxikusak, a kezelés során előnyösen az aktív hatóanyagból nagyobb mennyiségeket adunk be, mint ami az optimális eredmény eléréséhez szükséges.

Továbbá placenta-bikunin, annak izolált doménjai vagy más variánsai alkalmazhatók humán anyagokból, természetes hatóanyagok, például rokon proteázok izolálására, affinitásos technikán alapuló kromatográfias elválasztási eljárásokkal; vagy a proteázokkal szemben irányuló ellenanyagok előállítására, amely ellenanyagok azután placenta-bikunin szöveti megoszlásának és előnyös funkcióinak vizsgálatára alkalmazhatók.

Keresés humán szekvencia-adatbázisokban

Az aprotinin működésével homológ működésű humán protein létezésére az NCBI-ben („National Center for Biological Information”, Maryland), az „expressed-sequence-tag” (adott sejtben, megfelelő pontossággal lokalizált DNS-ről átíródó mRNS-szekvencia-részleteket tartalmazó) adatbázisban (a továbbiakban, dbEST) tárolt szekvenciák analízise alapján következtettünk. A TblastN-algoritmus alkalmazásával (BLAST vagy „Basic Local Alignment Search Tool”, amely Altschul és munkatársai eljárásának alkalmazásán alapul [J. Mol. Biol. 215, 403 (1990)] és egy kérdéses szekvencia, valamint az adatbázisban szereplő valamennyi egyéb protein- vagy nukleinsavszekvencia vagy azok bármely kombinációja közti hasonlóság kimutatására szolgál), az adatbázist szarvasmarha pre-pro-aprotinin, azaz a Trasylol™ szekvenciájával homológ nukleotidszekvenciákra nézve szűrtük. Ezt a számos klónra kiterjedő keresést, szelektív módon, két közelebbi klónra szűkítettük le, amelyekről feltételezhető volt, hogy azok funkciójukat tekintve az aprotininnal homológ humán proteinek megfelelő következtetett aminosavszekvenciát kódolnak. Az R35464 (12. azonosító számú szekven-

cia) és R74593 (14. azonosító számú szekvencia) jelzésű nukleinsavszekvenciákat választottuk ki, amelyek humán placentaeredetű nukleinsav-génkönyvtárból származtak. Az R35464-klón leghosszabb nyitott olvasási fázisa alapján transzlatált proteinszekvenciából (13. azonosító számú szekvencia) hiányzott a 6 cisztein egyike, amely a Kunitz-domén kovalens struktúra kialakításához kulcsfontosságú, arra utalva, hogy a R35464-klón nukleinsavszekvenciája nem eredményezhet funkcióképes inhibitort. Hasonlóképp, az R74593-klón leghosszabb nyitott olvasási fázisa alapján transzlatált proteinszekvencia (15. azonosító számú szekvencia) stopkodott tartalmazott a Kunitz-szerű szekvenciát kódoló régiótól 5'-irányban, ami azt jelenti, hogy ez a szekvencia nem transzlatálódhat funkcionális, szekretálódó Kunitz-doménná. A fenti szekvenciák jelentősége nem volt felmérhető. Azok lehettek: a) pszeudogének termékei; b) nem transzlatálódó mRNS-ek régiói; vagy c) működő mRNS-ek termékei, amelyek szekvenálási hibába csúszott.

Humán bikunin azonosítása

A tulajdonképpen humán szekvencia izolálása és meghatározása érdekében az R35464- és R74593-klónokban található, feltételezett Kunitz-szerű doménokat kódoló cDNS-szegmenstől 5'- és 3'-irányban található szekvenciákkal hibridizálódó cDNS láncindító oligonukleotidokat terveztünk. Az R35464-klónban található Kunitz-szerű szekvenciát kódoló fragmens amplifikációjára a következő láncindító oligonukleotidokat alkalmaztuk: CGAAGCTTCATCTCCGAAGCTCCAGACG (HindIII-helyet tartalmazó 3'-végi láncindító oligonukleotid; 33. azonosító számú szekvencia), valamint AGGATC-TAGACAATAATTACCTGACCAAGGA (XbaI-helyet tartalmazó 5'-végi láncindító oligonukleotid; 34. azonosító számú szekvencia).

A fenti láncindító oligonukleotidok alkalmazásával, a Clontech-től hozzáférhető humán placentaeredetű cDNS-génkönyvtárból (MATCHMAKER, katalógusszám: #HL4003AB, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA), PCR-technikával (30 ciklus alkalmazásával), egy 500 bázispár hosszúságú fragmenst amplifikáltunk, amelyet Bluescript-SK(+)-vektorba szubklónoztunk, és T3 láncindító oligonukleotiddal, Sequenase™ reagenskészlet 2,0 változatával szekvenáltunk. Meglepő módon az általunk alkalmazott láncindító oligonukleotidokkal amplifikált fragmens szekvenciája eltért a dbEST-adatbázisában R74593 nyilvántartási szám alatt szereplő szekvenciától. Közelebbről, az általunk meghatározott új szekvencia egy további guanozinbázist tartalmazott a feltételezett stopkodontól 3'-irányban, de a Kunitz-szerű szekvenciát kódoló szegmenstől 5'-irányban (3. ábra). Az említett további G-bázis inszerciója azt eredményezte, hogy a stopkodon eltolódott a Kunitz-szerű domén olvasási fázisához képest, és abba nem illeszkedett (a helyesbített R74593-szekvencia a 114. bázispár pozíciójában G-bázist tartalmaz, lásd 3. ábra).

A dbEST-adatbázisban végzett, az R74593-klón által kódolt Kunitz-szerű peptidszekvenciával homológ

szekvenciák kimutatására irányuló keresés eredményezte a H94519 jelzésű, humán retinaeredetű génkönyvtárból származó szekvenciát, valamint az N39798 jelzésű szekvenciát. Ezek a szekvenciák Kunitz-szerű szekvenciát tartalmaztak, amelyek csaknem megegyeztek az R35464-klón által kódolt Kunitz-szerű peptidszekvenciával, azzal az eltéréssel, hogy azok a doménra jellemző mind a hat ciszteint tartalmazták. A fenti nukleinsavszekvenciák és az R74593-szekvencia (a 114. bp pozíciójában G-bázis inszerciójával helyesbített szekvencia), valamint az R35464-szekvencia összevetése alapján részleges, humán placenta-bikuninnak megfelelő konszenzus-nukleotidszekvenciát határoztunk meg (9. azonosító számú szekvencia, 3. ábra). A konszenzusszekvencia translációja, a (-18.)-(+179.) pozícióknak megfelelő nyitott olvasási fázist eredményezett (lásd 3. ábra; a teljes transzlatált szekvenciát a 10. azonosító számú szekvencia mutatja), amely két teljes Kunitz-szerű doménszekvenciát tartalmazott, a 17-64. és 102-159. aminosavpozícióknak megfelelő régiókban.

További erőfeszítéseket tettünk, hogy további 5'-irányú szekvenciákat azonosítsunk, úgy, hogy a dbEST-adatbázisban az R35464-szekvenciával homológ szekvenciákat kerestünk. A fenti kereséssel kapott, feltételezetten hasonló, további 5'-irányú szekvenciákat tartalmazó szekvenciákkal ezután ismételt keresést végeztünk a dbEST-adatbázisban. Az ismételt keresésekkel egy sor átfedő 5'-irányú szekvenciát azonosítottunk, a következő klónokban: H16866, T66058, R34808, R87894, N40851 és N39876 (4. ábra). Több fenti szekvencia vizsgálata azt mutatta, hogy azokban a konszenzus transzlatált proteinszekvencia szintézisének potenciális starthelyeként szolgáló, 5'-irányú ATG-kodon van jelen. Az így kapott információk alapján most már szelektív szűrést végezhetünk aprotininnal homológ funkciójú humán proteinek megfelelő nukleinsav- és polipeptidszekvenciák azonosítására, és lehetővé vált azok szekvenciájának meghatározása.

A dbEST-adatbázisban végzett ismételt keresések számos új EST-szekvenciát eredményeztek, amelyeket a 4B. ábrán vázoltunk. A fenti, további EST-k összevetése alapján most már sokkal hosszabb konszenzus-oligonukleotidszekvenciát tervezhetünk (lásd 4C. ábra), amely a 3. ábrán látható eredeti oligonukleotidszekvenciához képest mind 5'-, mind 3'-irányban további szekvenciákat tartalmazott. Valójában, az új, összesen 1,6 kilobázis nagyságú szekvencia egészen a 3'-irányú poli-A-toldalékig terjedő szekvenciát tartalmazott. A szekvencia mentén az egyes nukleotidbázispár-pozícióknak megfelelő átfedő EST-k növekvő száma, egyes régiókban, például az EST-R74593-szekvencia 3'-végét átfedő régióban, növelte a meghatározás megbízhatóságát (3. ábra). A fenti régiót átfedő néhány EST analízise két kulcsfontosságú bázispár-delécióra derített fényt, az R74593-szekvenciához képest (a 4C. ábrán vastagon aláhúzva, a térképen a 994. és 1005. pozíciókban). Az új konszenzusszekvencia translációja (4D. ábra) a bikuninkódoló olvasási keretnek megfelelően az eredeti konszenzusszekvencia (1.

azonosító számú szekvencia) által kódolt, és az oligonukleotidkonszenzus olvasási fázisába illeszkedő stopkodon által befejeződésre készített érett (179 aminosavból álló) szekvenciánál nagyobb méretű (248 aminosavból álló) placenta-bikunin eredményezett. A méretnövekedést a 3'-végi kódoló régió olvasási fázisának eltolódása magyarázza, amelyet az EST-R74593-szekvenciára egyedileg jellemző két bázisinszerció eltávolítása eredményezett. Az olvasási fázis eltolódás következtében az eredeti konszenzusszekvencia stopkodonja (3. ábra) kikerült az olvasási fázisból, miáltal a leolvasás tovább folytatódhatott, a további aminosavszekvenciát kódoló új olvasási fázisban. Az új translációs termék (4D. ábra) az (+1.)-(+175.) pozíciók közt megegyezett az eredeti (Kunitz-doménokat kódoló) protein konszenzusszekvenciájával (1. azonosító számú szekvencia), de új, 24 aminosavból álló, potenciális transzmembrándoménnak megfelelő C-terminális toldalékot tartalmazott (lásd a 4D. ábrán aláhúzással jelölve), amelyet a szekvenciában rövid, 31 aminosavból álló citoplazmadomén követett. A kezdő metionin és szignálpeptid környezetében található szekvenciák meghatározása bizonytalanabb volt, mivel ebben a régióban az átfedő EST-k jelentős heterogenitást mutattak.

A proteinszekvencia Geneworks™ programcsomaggal történő analízise szerint a 30. és 67. pozíciókban potenciális N-kötésű glikozilezési konszenzus helyeknek megfelelő aszparagin-aminosavak találhatóak. A teljes hosszúságú protein N-terminális szekvenálása során a 30. pozícióban kimutatott aszparagin nem volt megfigyelhető, ami annak glikozileződésével magyarázható.

Humán bikunin klónozása

A 3. ábra szerinti szekvencia analízise alapján következtetett humán bikunin nukleinsavszekvenciának megfelelő humán mRNS létezését a következőképp igazoltuk. Az R35464-szekvencia Kunitz-doménokat kódoló cDNS-ének 5'-végével (a 3. ábra szerinti konszenzus-nukleotidszekvencia 3–27. bázispárjaival) hibridizálódó nukleinsav láncindító oligonukleotid: GGTCTAGAGGCCGGGTCGTTTTCTCGCCTGGCTGGGA (az R35464-szekvenciából származó, XbaI-helyet tartalmazó 5'-végi láncindító oligonukleotid); 35. azonosító számú szekvencia) és az R74593-szekvencia Kunitz-doménokat kódoló szekvenciájának 3'-végével (a 3. ábra szerinti konszenzus-nukleotidszekvencia 680–700. bázispárjaival) hibridizálódó nukleinsav láncindító oligonukleotid alkalmazásával, a Clontectől hozzáférhető humán placentaeredetű génkönyvtárból, PCR-technikával, a 3. ábra szerinti, placenta-bikunin szekvenciát kódoló cDNS konszenzus-nukleinsavszekvencia méretének megfelelő (körülbelül 670 bp) fragmenst amplifikáltunk (vázlatosan, lásd a 4A. ábrán).

Az R87894-klónban található szekvenciával, a fent említett, feltételezett ATG-starthelytől 126 bázispár távolságra, attól 5'-irányban hibridizálódó 5'-végi láncindító oligonukleotid (vázlatosan lásd a 4A. ábrán, a 110. bázispár pozíciójában), valamint a fent ismertetett,

R74593-szekvenciával hibridizálódó 3'-végi láncindító oligonukleotid alkalmazásával, a Clontectől hozzáférhető humán placentaeredetű génkönyvtárból, az átfedő EST-k alapján következtetett, várakozásnak megfelelő méretű (körülbelül 872 bázispárból álló) fragmenst amplifikáltunk (vázlatosan lásd a 4. ábrán).

A 872 bázispárból álló fragmens szekvenálása szerint az az 5'-végen, az EST-R87894 110–218. bázispárjainak megfelelő nukleotidszegmenst tartalmazott, 3'-végén pedig az átfedő EST-k analízise alapján következtetett placenta-bikunin konszenzusszekvencia (lásd 3. ábra) 310–542. bázispárjainak megfelelő nukleotidszegmenst tartalmazott. Ez a 3'-végi nukleotidszekvencia tartalmazta a placenta-bikunin által kódolt teljes Kunitz-szerű domént (102–159.).

Abból a célból, hogy a protein teljes extracelluláris régióját kódoló cDNS-t megkapjuk, az EST-R34808-szekvenciával hibridizálódó 5'-végi PCR láncindító oligonukleotid: CACCTGATCGCGAGACCCC (36. azonosító számú szekvencia) és a fent ismertetett, EST-R74593-szekvenciával hibridizálódó 3'-végi láncindító oligonukleotid alkalmazásával, humán placentaeredetű cDNS-génkönyvtárból, körülbelül 780 bázispárból álló cDNS-terméket amplifikáltunk (30 ciklus alkalmazásával). Ezt a terméket gélen tisztítottuk, és a TA-vektorba (Invitrogen) klónoztuk, majd a DNS-t didezoxieljárással [Sanger F. és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74, 5463 (1977)] szekvenáltuk, a következő láncindító oligonukleotidok alkalmazásával:

Vektorspecifikus:
GATTTAGGTGACACTATAG (SP6) (37. azonosító számú szekvencia);
TAATACGACTCACTATAGGG (T7) (38. azonosító számú szekvencia).

Génspecifikus:
TTACCTGACCAAGGAGGAGTGC (39. azonosító számú szekvencia);
AATCCGCTGCATTCCTGCTGGTG (40. azonosító számú szekvencia);
CAGTCACTGGGCCTTGCCGT (41. azonosító számú szekvencia).

A kapott cDNS-szekvenciát, annak translációs termékével együtt, a 4E. ábrán ábrázoltuk. Nukleotidszinten a szekvencia csak csekély mértékben tért el a konszenzus-EST-szekvenciától (4D. ábra). A szekvencia translációja olyan szekvenciát eredményezett, amely olvasási fázisba illeszkedő ATG-kezdőkodont, szignálpeptidet, érett placenta-bikunin kódoló szekvenciát és transzmembrándomént tartalmazott. A PCR-termék transzlatált szekvenciájából hiányzott a citoplazmadomén 12 utolsó aminosava, a PCR-reakcióban alkalmazott 3'-végi láncindító oligonukleotid megválasztása következtében. A fenti (az R74593-szekvencia alapján tervezett) 3'-végi PCR láncindító oligonukleotid tehető felelőssé azért is, hogy a PCR-eredetű, a transzlatált szekvencia 211. aminosavpozíciójában, mesterségesen előidézett S-F mutáció jött létre. A PCR-fragmens translációja alapján következtetett szignálpeptid némileg eltért az EST-konszenzus megfelelő szekvenciájától.

A teljes hosszúságú placenta-bikunin cDNS-szekvencia meghatározására a PCR-eredetű terméket (lásd 4E. ábra) gélen tisztítottuk, és a bikuninszekvenciát képviselő, nem PCR-eredetű, teljes hosszúságú klón izolálására alkalmaztuk. A PCR-eredetű cDNS-szekvenciát a „High Prime” (Boehringer Mannheim) reagenskészlet alkalmazásával, ³²P-CTP-vel jelöltük, és próbaként alkalmaztuk, placentaeredetű cDNS-génkönyvtár (Stratagene, Unizap™ λ-génkönyvtár) szűrésére, telephibridizációs technikával. Körülbelül 2×10⁶ fágplakkot 3 ciklusban szűrtünk és plakktisztítottunk. Restriktációs enzim analízis és az EST-konszenzusszekvencia méretével (lásd fent) történő összehasonlítás alapján két klónt ítéltünk teljes (körülbelül 1,5 kilobázis) hosszúságúnak. A fenti két klón egyikének didezoxieljárással történő szekvenálása a 4F. ábra szerinti oligonukleotidszekvenciát eredményezett. A fenti szekvencia translációja, olvasási fázisba illeszkedő kezdő metionint, szignálpeptidet és érett placenta-bikunin szekvenciát tartalmazó proteint eredményezett. Az érett placenta-bikunin szekvencia megegyezett az EST-konszenzus translációjával kapott érett protein szekvenciájával, bár a szignálpeptid-szekvencia hossza és szekvenciája eltért az utóbbi által kódolt szekvenciától. Szemben a PCR-eredetű termékkel, a telephibridizációs eljárással nyert cDNS tartalmazta a teljes ektodomént, transzmembrándomént, citoplazmadomént és olvasási fázisba illeszkedő stopkodont. Valójában a klón egészen a poli-A-toldalékig terjedő szekvenciát tartalmazott. A kezdő metionint hidrofób szignálpeptid követte, amely megegyezett a PCR-eredetű klón által kódolt szignálpeptiddel. A fentieket követően a placenta-bikunin egy szolúbilis fragmensét – a placenta-bikunin (1–170.)-fragmenst – Sf9-sejtekben expresszáltattuk, azokból tisztítottuk (lásd 9. példa), és azt találtuk, hogy az funkcionális proteázgátló (10. példa). Továbbá humán placentából a placenta-bikunin egy további szolúbilis fragmensét izoláltuk, amely szintén aktív proteázgátló hatásának bizonyult (7. példa). Mind a természetes protein, mind annak Sf9-sejtekben expresszált formája feltehetően glikozilezett, a 30. pozícióban található aszparaginak megfelelően; legalábbis erre utalnak az N-terminális szekvenálás során nyert PTH-aminosavak (lásd 7. és 9. példa).

A fenti megfigyelések alapján, úgy tűnik, hogy a teljes hosszúságú placenta-bikunin előfordulhat transzmembránproteinként, a sejtek felszínén és szolúbilis proteinként. Egyéb, Kunitz-domént tartalmazó transzmembránproteinekről ismert, hogy azok proteolitikus folyamat révén szolúbilis és membránasszociált formák elegyivé alakulhatnak. Ilyen proteinek például az amiloid-prekursor protein két formája, az APP751 [Esch F. és munkatársai: Science 248, 1122 (1990)] és az APP770 [Wang R. és munkatársai: J. Biol. Chem. 266, 16 960 (1991)].

Kontaktaktiváción olyan folyamatot értünk, amely azáltal aktiválódik, hogy sérült vaszkuláris felszínre érintkezésbe kerülnek a koagulációs kaszkád összetevőivel. Az angiogenezisben a plazmin endotheliális fel-

színeken bekövetkező lokális aktivációja játszik szerepet. A placenta-bikunin specifitása, és annak azon sajátossága, hogy sejtfelszínhez képes lehorgonyozódni, arra utal, hogy a placenta-bikunin transzmembrán formája fiziológiásan részt vesz a kontaktaktiváció és az angiogenezis szabályozásában.

A placenta-bikunin-(7–64.)- és bikunin-(102–159.)-fragmensek, valamint a teljes hosszúságú placenta-bikunin szekvencia (4F. ábra) alkalmazásával keresést végeztünk a PIR- (46,0 változat) és PatchX- (46,0 változat) protein-adatbázisokban, valamint a szabadalmaztatott szekvenciákat tároló GeneSeq (20,0 változat) protein-adatbázisban, a „Genetics Computer Group” FastA-programjának alkalmazásával. A „Genetics Computer Group” által kidolgozott TFAST-program alkalmazásával [Pearson és Lipman: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444 (1988)] a fenti proteinszekvenciákra kerestünk rá a GenBank (1/26/96 dátumig naprakész állapotba hozott 92,0 változat) és az EMBL (módosított 45,0 változat) nukleotid-adatbázisok hatfázisú translációival („six frame translations”), valamint a GeneSeq szabadalmaztatott szekvenciákat tartalmazó nukleotid-adatbázisával (20,0 változat). Ezúttal a GenBank és EMBL EST- és STS-részhalmozaira nem terjedt ki a keresés. A fenti keresés által eredményezett legjobb találatok szekvenciái, teljes hosszuk mentén, csupán körülbelül 50%-os egyezést mutattak az R74593- és R35464-klónok analízisével kapott, 58 aminosavból álló proteinszekvenciával.

Humán bikunin izolálása

A fent említettek szerint a bikunin transzlatált konszenzusszekvenciája (lásd 3. ábra) alapján meghatározott bikunin-(7–64.)- és bikunin-(102–159.)-fragmenseknek megfelelő szintetikus peptidok képesek voltak újrahajtogatódni (felvenni a natív konformációt) (lásd 2. és 1. példák), és azokból így aktív kallikreininhibitor protein volt nyerhető (lásd 4. és 3. példák). Ezt a váratlan sajátosságot használtuk ki natív placenta-bikunin humán szövetből történő izolálására alkalmas tisztítási eljárás kidolgozására.

Az említett tisztítási eljárással, amely első lépésben kallikrein-sepharose affinitásos kromatográfia alkalmazásán alapult, magas tisztasági fokú, natív, hatékony inhibitorot izoláltunk. Az izolált natív, humán bikunin N-terminális (50 aminosavig bezárólag szekvenált) szekvenciája megegyezett a konszenzus-nukleinsav-szekvencia (lásd 3. ábra) translációja alapján, az (+1)–(+50.) aminosavpozícióknak megfelelően következtetett szekvenciával (lásd 7. példa). Ez volt az első bizonyítéka humán placentából izolálható, új, natív kallikreininhibitor létezésének.

Az alábbiakban ismert Kunitz-szerű doménokat soroltunk fel. A célproteázokkal nagy valószínűséggel érintkezésbe kerülő, különös érdeklődésre számot tartó aminosavakat kiemeltük (vastagon aláhúzva). Ezeket az aminosavakat a könnyebb értelmezhetőség kedvéért Xaa^{1–16} elnevezéssel illettük, az alábbi Xaa-jelöléseknek megfelelően:

Xaa									1	1	111	1	1
	1	2	3	4	5	6	7	8	0	1	234	5	6
1) IHDFCLVSKVV	GRCR	ASMP	PRW	WYN	VDG	SCQ	LFVY	GGCD	GN	SNNY	LTKE	EEC	LKKCATV
2) YEEYCTANAVT	GPCR	ASPP	PRW	YFD	VERN	NSCN	NFIY	GGCR	GN	KNSY	RSEE	EAC	MLRCFRQ
3) -HSFCAFKADD	GPCA	AIMK	RKF	FFNI	FTRQ	CE	EFIY	GGCE	GN	QNR	ESLE	EAC	KKMCTRD
4) -PDFCFLEEDP	GICR	GYIT	TRY	FYNN	QTKQ	CE	RFKY	GGCL	GN	MNN	ETLE	EAC	KNICEDG
5) -PSWCLTPADR	GLCR	AHEN	RNF	YNSV	VIGK	CR	PFKY	SGCG	GN	ENN	FTSK	QEC	LRACKKG
6) -AEICLLPLDY	GPCR	ALLR	Y	YRYR	TQSC	R	QFLY	GGCE	GN	ANN	YTWE	EAC	DDACWRI
7) -PSFCYSPKDE	GLCS	ANVT	RY	YFN	PRYR	TC	AFTY	TGCG	GN	DNN	VSRE	DC	KRACAKA
8) -KAVCSQEAMT	GPCR	AVMP	RPT	TFDL	SKGK	CV	RFIT	GGCG	GN	RNN	FESE	DC	MAVCKAM
9) RPDFCLEPPYT	GPCK	ARI	RY	FYNA	KAGL	CQ	TFVY	GGCR	AK	RNN	FKSA	EDC	MRTCGBA
10) ---CQLGYS	GPCM	GMTS	RY	FYNG	TSM	ACE	TFQY	GGCM	GN	GNN	FVTE	KEC	LQTC
11) VAACNLPIVR	GPCR	AFIQ	LW	AFDA	VKGK	CV	LFPY	GGCQ	GN	GNK	FYSE	KEC	REYCGVP
12) -EVCCSEQAET	GPCR	AMIS	SRW	YFDV	TEGK	CA	PFY	GGCG	GN	RNN	FDTE	EYC	MAVCGSA
13) ---CKLPKDE	GTCR	DPIL	KW	YYDP	NTKS	CA	RFWY	GGCG	GN	ENK	FGSQ	KEC	EKVC
14) -PNVCAFPEK	GPCQ	TYM	TRW	FFNF	ETGE	CE	LFAY	GGCG	GN	SNN	FLRKE	KEC	EKFCFKT

A szekvenciákat az alábbiak szerint számoztuk: 1. szekvencia: Bikunin-(1-64.) (4. azonosító számú szekvencia); 2. szekvencia: Bikunin-(102-159.) (6. azonosító számú szekvencia); 3. szekvencia: 1. szöveti faktor út inhibitor prekursor (18. azonosító számú szekvencia); 4. szekvencia: 1. szöveti faktor út inhibitor prekursor (19. azonosító számú szekvencia); 5. szekvencia: szöveti faktor út inhibitor prekursor (20. azonosító számú szekvencia); 6. szekvencia: 2. szöveti faktor út inhibitor prekursor (21. azonosító számú szekvencia); 7. szekvencia: 2. szöveti faktor út inhibitor prekursor (22. azonosító számú szekvencia); 8. szekvencia: Amiloid prekursor protein homológ (23. azonosító számú szekvencia); 9. szekvencia: Aprotinin (24. azonosító számú szekvencia); 10. szekvencia: Inter- α -tripszin inhibitor prekursor (25. azonosító számú szekvencia); 11. szekvencia: Inter- α -tripszin inhibitor prekursor (26. azonosító számú szekvencia); 12. szekvencia: Amiloid prekursor protein (27. azonosító számú szekvencia); 13. szekvencia: Kollagén- α -3(VI)-prekursor (28. azonosító számú szekvencia); és 14. szekvencia: HKI-B9 (29. azonosító számú szekvencia).

Látható, hogy a placenta-bikunin (7-64.)- és (102-159.)-fragmensek, a szerinproteáz-inhibitorok Kunitz-osztályának többi képviselőjével megegyező számú (hat) cisztein-aminosavat tartalmaznak, egymástól ugyanolyan távolságban, mint az a fenti peptid-inhibitorokra jellemző. A cisztein-aminosavak összekapcsolódásának pontos mechanizmusa, amelynek révén a három, láncon belüli diszulfidhíd létrejön, ismert, és az a Kunitz-család valamennyi tagja esetében azonos [Laskowski M. és munkatársai: *Ann. Rev. Biochem.* 49, 593 (1980)]. Az ismert összekapcsolódási minta és azon tény az alapján, hogy a placenta-bikunin-(7-64.)- és -(102-159.)-fragmensek hajtogatódása aktív peptidinhibitorra három, láncon belüli diszulfidhíd képződésének megfelelő tömegvesztéssel jár (lásd 2. és 1. példák), nagyon valószínű, hogy a placenta-bikunin Kunitz-doménjain belül a diszulfidkötések a C11. és C61.; C20. és C44.; C36. és C57.; C106. és C156.; C115. és C139.; valamint C131. és C152. pozíciókban található cisztein-aminosavak közt jönnek létre. Továbbá igen valószínű, hogy a diszulfidkötések képződése,

a mindkét Kunitz-domént tartalmazó, placenta-bikunin hosszabb formái esetében is a fenti minta szerint megy végbe, mivel a protein ilyen formái ugyancsak aktív szerinproteáz-inhibitorok, és mivel a natív placenta-bikunin, 50 cikluson keresztül végzett N-terminális szekvenálása (lásd 7. példa) a cisztein-aminosavak várható pozícióinak megfelelően „néma” szekvenciát eredményezett.

A találmány szerinti placenta-bikunin, annak izolált doménjai vagy más variánsai előállíthatók ismert szilárd fázisú peptidszintézis-technikákkal, például t-Boc-kémiával [lásd például Merrefield R. B. és Barany G.: „The peptides, Analysis, Synthesis, Biology”, 2. kötet, 1. fejezet, szerk.: Gross és munkatársai, Academic Press (1980)] vagy F-moc-kémiával [lásd például Carpino L. A. és Han G. Y.: *Amer. Chem. Soc.* 92, 5748 (1970); valamint a 2. példában szemléltetett módon]. Más eljárás szerint placenta-bikunin-variánsot kódoló DNS expresszállásával rekombináns, placenta-bikunin-variánsokat nyerhetünk.

A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti, placenta-bikuninprotein variánsokat kódoló DNS-konstrukciók. Ezeket a konstrukciókat előállíthatjuk szintetikus úton, például Beaucage S. L. és Caruthers M. H. [Tetrahedron Lett. 22, 1859 (1981)] vagy Matteucci M. D. és Caruthers M. H. [J. Am. Chem. Soc. 103, 3185 (1981)] által ismertettek szerint; vagy DNS vagy cDNS alapján, amelyeket genomi eredetű vagy cDNS-génkönyvtárak szűrésével nyerhetünk, például úgy, hogy a génkönyvtárat placenta-bikunint kódoló DNS-szekvenciával hibridizálódó cDNS-próbával hibridizáltatjuk. A genomi eredetű DNS-szekvenciákat vagy cDNS-szekvenciákat egy vagy több pozícióban módosíthatjuk, hogy a leírásban említett aminosavszubsztitúciókat vagy deléciókat kódoló cDNS-szekvenciákat kapjunk.

A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti, placenta-bikunint, annak izolált doménjait vagy más variánsait kódoló DNS-konstrukciókat tartalmazó expressziós vektorok, amelyek alkalmazhatók rekombináns placenta-bikunin-variánsok előállítására. A cDNS-t megfelelő, az adott gazdasejtben transzkripciós aktivitást mutató promotorszekvenciával kell

összekapcsolnunk, ezenfelül annak megfelelő terminátorszekvenciát és poliadenilezési szignált kell tartalmaznia. A placenta-bikunin-variánst kódoló cDNS-t 5'-irányú szignálpeptiddel fuzionáltathatjuk, ami a cDNS által kódolt protein szekretálódását eredményezi. Szignálpeptidként a gazdaszervezet által felismert szekvenciát alkalmazunk. Emlőseredetű gazdasajt esetében szignálpeptidként alkalmazhatjuk a teljes hosszúságú placenta-bikuninban jelen levő természetes szignálpeptidet is. A placenta-bikunin-variánsok expresszáására alkalmazható vektorok előállítására alkalmas eljárások a technika állása szerint jól ismertek, ilyeneket ismertetnek például Sambrook és munkatársai [„Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor, New York (1989)].

Ezenfelül a találmány tárgyát képezik a találmány szerinti, placenta-bikunint, annak izolált doménjait vagy más variánsait kódoló DNS-konstrukciókat tartalmazó transzformált sejtek, amelyek alkalmazhatók rekombináns placenta-bikunin-variánsok előállítására. A placenta-bikunin-variánsok előállítására expressziós vektorok és gazdaszervezetek számos kombinációja alkalmazható. Gazdasejtként alkalmazhatjuk például a következőket: baculovírusfertőzött Sf9-rovarsejteket; emlőssejteket, például BHK-, CHO-, HeLa- és C127-sejteket; baktériumokat, például *E. coli*-sejteket; vagy élesztőket, például *Saccharomyces cerevisiae* sejteket. Emlős, rovar és mikrobiális expressziós rendszerek alkalmazására vonatkozó eljárások, amelyek alkalmazásával a placenta-bikunint expresszáltathatjuk, a technika állása szerint jól ismertek; azok leírását megtalálhatjuk például a következő szakirodalmi helyen: Ausubel F. M. és munkatársai: „Current protocols in Molecular Biology”, John Wiley & Sons, 16. fejezet (1995). Csupán egyetlen Kunitz-domént tartalmazó placenta-bikunin-fragmensek, például a bikunin-(7–64.)- és -(102–159.)-fragmensek esetében előnyösen élesztő vagy *E. coli* expressziós rendszereket alkalmazunk, és legelőnyösebben élesztő expressziós rendszert alkalmazunk. Tipikusan, az 5 164 482 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, aprotinvariánsok vonatkozásában ismertettek szerint idézünk elő expressziót, élesztősejtekben; ennek az eljárásnak az 5. példában ismertett változata szerint jártunk el, a placenta-bikunin-(102–159.)-fragmens expresszáltatásakor. *E. coli*-sejtekben idézhetünk elő expressziót például az 5 032 573 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertettek szerint. Nagyobb méretű, mindkét inhibitor domént tartalmazó placenta-bikunin-variánsok, például a bikunin-(7–159.)-variáns expresszáltatásakor előnyösen emlős vagy élesztő rendszereket alkalmazunk.

A természetes aminosavszekvenciában aminosavszubsztitúciót hordozó placenta-bikunin-variánsokat kódoló DNS-eket előállíthatunk rekombináns proteinek expresszállása céljából, például Kunkel T. A. eljárása szerint [Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 488 (1985)]. Röviden, a mutagenezissel módosítani kívánt DNS-t egyszálú bakteriofágvektorba, például M13-vektorba klónozzuk. Az egyszálú DNS-sel, a módosítandó régiót

átfedő, és a kívánt szubsztitúciót kódoló oligonukleotidot hibridizáltatunk, majd molekuláris biológiai technikákkal, kettős szálú DNS-t szintetizálunk. Ezt követően ezzel a DNS-sel megfelelő bakteriális gazdasejteket transzformálunk, és didezoxinukleotid-szekvenálással a szekvencia helyességét ellenőrizzük. A helyes szekvenciájú DNS-t expressziós plazmidba klónozzuk. Más eljárás szerint a célzott DNS ismert PCR-technikákkal mutagenizálható, szekvenálható, és megfelelő expressziós plazmidba inszertálható.

A találmány szerinti megoldást az alábbiakban konkrét megvalósítási példákon keresztül kívánjuk szemléltetni, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertettekre korlátoznánk.

1. példa

Szintetikus placenta-bikunin (102–159.) előállítása Alkalmazott anyagok/reagensok és eljárások

A Tos-Gly-Pro-Lys-AMC fluorogén szubsztrátot a Bachem BioScience Inc. (King of Prussia, PA) cégtől, a PNGB, Pro-Phe-Arg-AMC és Ala-Ala-Pro-Met-AMC reagenseket, szarvasmarhatripsint (III-as típus), humán plazmaeredetű kallikreint és humán plazmint a Sigma (St. Louis, MO) cégtől vásároltuk. A rekombináns aprotin (Trasylo[®]) Bayer AG (Wuppertal, Németország) eredetű volt. Gyárilag Gln-kezelt Wang gyantát a Novabiochem (La Jolla, CA) cégtől, tioanizolt, etándiolt és t-butil-metil-étert az Aldrich (Milwaukee, WI) cégtől rendeltünk.

Funkcionális placenta-bikunin (7–64.)-fragmens és (102–159.)-fragmens mennyiségi meghatározása

A tisztítás különböző fokán álló, újrarahajtogatódott proteinmintában található tripszininhibitor-aktivitást GPK-AMC-reagens szubsztrátként történő alkalmazásával határoztuk meg. Szarvasmarhatripsint (200 pmol) inkubáltunk, 5 percen át, 37 °C-on, a tisztítás különböző fokán álló bikunin (7–64.) vagy bikunin (102–159.) mintával, „A” jelzésű pufferben (50 mmol/l Hepes, pH=7,5, 0,1 mol/l NaCl, 2 mmol/l CaCl₂ és 0,01% Triton-X-100). Az elegyhez ezután GPK-AMC-reagenst adtunk (20 µmol/l végkoncentrációban), és a keletkező kumarin mennyiségét fluoreszcenciameréssel határoztuk meg (excitáció: 370 nm, emisszió: 432 nm hullámhosszon), 2 percen át, „Perkin-Elmer LS-50B” fluoriméteren. Az egyes vizsgált minták %-ban kifejezett gátlási értékeit az 1. egyenlet szerint számítottuk ki:

$$\text{gátlás \%} = 100 \times [1 - R_0/R_1]; \quad (1.)$$

ahol R_0 a fluoreszcencianövekedés mértéke gátlóanyag jelenlétében, és R_1 a növekedés mértéke hozzáadott minta nélkül. A gátlóanyag aktivitásának egy egységét az aktivitás azon mértékével definiáltuk, ami a fenti mérési körülmények mellett 50% gátlás eléréséhez szükséges.

Szintézis: Placenta-bikunin (102–159.)-peptidet „Applied Biosystems 420A” típusú peptidszintetizáló berendezésen, NMP-HBTU Fmoc kémiai eljárással szintetizáltunk. A peptidet gyárilag töltött Gln-gyanta oszlopon szintetizáltuk; minden kapcsolásnál 8-szoros aminosavfőlöleget alkalmaztunk. Hasítást és védőcso-

port-eltávolítást 2 órán át, szobahőmérsékleten végeztünk, az alábbi összetételű elegyben: 84,6% trifluor-ecetsav (TFA), 4,4% tioanizol, 2,2% etándioliol, 4,4% folyékony fenol és 4,4% H₂O. A nyers peptidet precipitáltuk, centrifugáltuk és t-butil-metil-éterrel kétszer mos-
5

HPLC-oszlopon tisztítottuk, TFA/acetonitril gradiens alkalmazásával. A végső készítmény (61,0 mg) a várható szekvenciának megfelelő aminosav-összetételt és elektropray-tömegspektroszkópiás eljárással becsült molekulatömeget eredményezett (MH+=6836,1; számított molekulatömeg=6835,5):

YEEYCTANAV TGPCRASFP R WYFDVERN SC NNFIYGGCRG NKNSYRSEEA CMLRCFRQ
(6. azonosító számú szekvencia).

Tisztítás: Placenta-bikunin (102–159.)-peptid eredeti konformációba történő hajtogatódását váltottuk ki, Tam és munkatársai által ismertetett eljárás szerint [J. Am. Chem. Soc. 113, 6657–62 (1991)]. A tisztított peptid egy részét (15,2 mg) 4,0 ml térfogatnyi, 8 mol/l ureát tartalmazó, 0,1 mol/l Tris-pufferben (pH=6,0) oldottuk. A diszulfidcsoportokat úgy oxidáltuk, hogy cseppenként, 23% DMSO-t és 0,1 mol/l Tris-t (pH=6,0) tartalmazó elegyet adagoltunk, olyan mennyiségben, hogy a peptid végkoncentrációja 0,5 mg/ml legyen, 20% DMSO-t, 0,1 mol/l Tris-t (pH=6,0) és 1,0 mol/l ureát tartalmazó elegyben. Ezt az elegyet 25 °C-on, 24 órán át kevertük, majd 50 mmol/l Tris-t (pH=8,0) és 0,1 mol/l NaCl-ot tartalmazó pufferrel 1:10 arányban hígítottuk. A peptidet kallikrein affinitás oszlopon tisztítottuk, amelyet úgy állítottunk elő, hogy 30 mg, szarvasmarhahasnyálmirigy-eredetű kallikreint, kovalens kötéssel (Bayer AG) 3,5 ml CNBr-aktivált Sepharose (Pharmacia) hordozóhoz kapcsolunk, a gyártó utasításai szerint. Az újrashajtogatott (eredeti konformációjú) peptidet 1 ml/perc átfolyási sebességgel az affinitásos oszlopra vittük, majd

50 mmol/l Tris-t (pH=8,0) és 0,1 mol/l NaCl-ot tartalmazó pufferrel addig mostuk, amíg a mosófolyadékban 280 nm hullámhosszon már nem volt tapasztalható fényelnyelés. A peptidet az oszlopról 3-3 térfogatnyi, 4,0 és 1,7 pH-értékű, 0,2 mol/l ecetsavval eluáltuk. Az aktív frakciókat összegyűjtöttük (lásd lentebb), és az elegy pH-ját 2,5 értékre állítottuk. Ezt az elegyet közvetlenül „Vydac C18” típusú reverz fázisú oszlopra (5 mikron, 0,46×25 cm) vittük fel, amelyet előzőleg, 0,1% TFA-ban elegyített 22,5% acetonitriloldattal ekvilibráltunk. Az elválasztást 0,1% TFA-ban elegyített 22,5–40,0% lineáris acetonitrilgradienssel végeztük, 1 ml/perc átfolyási sebesség mellett, 40 percen át. Az aktív frakciókat összegyűjtöttük, liofileztük, 0,1% TFA-ban újraoldottuk, és felhasználásig –20 °C-on tároltuk.

Eredményeink: Szintetikus placenta-bikunin (102–159.)-fragmens eredeti konformációba történő hajtogatódását váltottuk ki, oxidálóagensként 20% DMSO alkalmazásával, majd azt kétféle tisztítási eljárásnak vetettük alá (lásd alábbiakban), hogy aktív tripszininhibitort kapjunk (lásd alábbi 1. táblázatot).

1. táblázat

Szintetikus placenta-bikunin (102–159.)-fragmens izolálására használt tisztítási eljárás menete

Tisztítási lépés	Térfogat (ml)	mg/ml	mg	Egység ^c (U)	Specifikus aktivitás (U/mg)	Hatásfok
8 mol/l urea	4,0	3,75 ^a	15,0	0	0	–
20% DMSO	32,0	0,47 ^a	15,0	16 162	1 078	100
Kallikrein affinitáskromatográfia	9,8	0,009 ^b	0,09	15 700	170 000	97
C18	3,0	0,013 ^{ab}	0,04	11 964	300 000	74

^aFehérjemeghatározás, AAA (aminosavanalízis) alapján.

^bFehérjemeghatározás, 280 nm hullámhosszon mért fényelnyelés (OD280) alapján, a tisztított protein fajlagos extinkciós koefficiensével ($1,7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) számolva.

^cEgy egységnek azt a proteinnennyiséget tekintettük, amely a tripszinaktivitás 50%-ának gátlásához szükséges, standard vizsgálatban.

A nyers újrashajtogatódott anyagnak immobilizált szarvasmarha-kallikreint tartalmazó oszlopon történő kromatografálása az anyagban található proteintartalom 6%-ának és a tripszininhibitor-aktivitás 97%-ának szelektív izolálását eredményezte. Az ezt követő C18 reverz fázisú kromatográfia további kétszeres tisztítást eredményezett, 74%-os hatásfokkal. Reverz fázisú HPLC- (RPHPLC-) eljárás szerint a redukált

placenta-bikunin (102–159.)-fragmenst 26,3 perc, míg a újrashajtogatódott formát 20,1 perc elúciós idő jellemezte. A tisztított protein tömegspektroszkópiás vizsgálata 6829,8 molekulatömeget mutatott, ami a kiindulási anyaghoz képest 6 tömegegység-csökkenést jelentett. Ez a peptidszekvencia alapján várható 3 diszulfidhíd maradéktalan kialakulására utalt.

A tisztított, újrachajtogatódott, szintetikus placenta-bikunin (102–159.)-fragmens izoelektromos pontját „Multiphor II Electrophoresis System” (Pharmacia) készülék alkalmazásával határoztuk meg. A mintát a gyártó utasításai szerint futtattuk, pl-standardokkal párhuzamosan, gyárilag öntött „Ampholine® PAGplate” (pH=3,5–9,5) lemezek alkalmazásával; a fókuszálást 1,5 óráig végeztük. Festést követően meghatároztuk a különböző proteincsíkok és a gél katód felőli széle közti migrációs távolságokat. Az egyes ismeretlen minták pl-értékét olyan standard görbe segítségével határoztuk meg, amelyen standardminták migrációs távolságait ábrázoltuk, az azokhoz tartozó pl-értékek függvényében. A fenti eljárás szerint a placenta-bikunin (102–159.)-fragmens pl-értéke 8,3-nek bizonyult, ami egyezett az aminosavszekvencia alapján várható értékkel. Ez a pl-érték alacsonyabb, mint az aprotinin pl-értéke (10,5) [Tenstad és munkatársai: Acta Physiol. Scand. 152, 33–50 (1994)].

2. példa

Szintetikus placenta-bikunin (7–64.)-fragmens előállítás

Placenta-bikunin (7–64.)-fragmenst lényegében a bikunin (102–159.)-fragmens esetében fent ismertetettek szerint szintetizáltunk, hajtogatunk újra és tisztítottunk, az alábbi eltérésekkel: az újrachajtogatódás alatt a szintetikus peptidet 30 órán át, 25 °C-on, 20% DMSO-t tartalmazó oldatban kevertük; a C–18 reverz fázisú HPLC-eljárással történő tisztítást 0,1% TFA-t tartalmazó, 25–40% lineáris acetonitrilgradienssel végeztük, 40 percen át, 1 ml/perc átfolyási sebesség mellett. Az első C18-elválasztásból származó aktív frakciókat újra felvittük az oszlopra, és ezúttal 0,1% TFA-t tartalmazó, 20–40% lineáris acetonitrilgradienssel (60 perc, 1 ml/perc) eluáltunk.

Eredményeink: A végső, tisztított peptid MH+=6563 molekulatömegűnek bizonyult, ami összhangban volt az alábbi szekvencia alapján várt molekulatömeggel:

IHDVCLVSKV VGRCRASMPR WWYNVTDGSC QLFVYGGCDG NSNNYLTKEE CLKKCATV
(4. azonosító számú szekvencia).

Az újrachajtogatódás és tisztítás funkcionális Kunitz-domént eredményezett, amely tripszininhibitor hatású volt (lásd alább a 2. táblázatot).

2A. táblázat

Szintetikus placenta-bikunin (7–64.)-fragmens izolálására szolgáló tisztítási eljárás menete

Tisztítási lépés	Térfogat (ml)	mg/ml	mg	Egység (U)	Specifikus aktivitás (U/mg)	Hatásfok
8,0 mol/l urea	8,0	2,5	20,0	0	0	–
20% DMSO	64,0	0,31	20,0	68 699	3 435	100
Kallikrein affinitásos kromatográfia pH=4	11,7	0,10	1,16	43 333	36 110	62
Kallikrein affinitásos kromatográfia pH=1,7	9,0	0,64	5,8	4 972	857	7,2
C18–1	4,6	0,14	0,06	21 905	350 143	31,9
C18–2	1,0	0,08	0,02	7,937	466 882	11,5

A tisztított, újrachajtogatódott protein 6558 MH+ értéket mutatott, azaz 5 ± 1 tömegegységgel kevesebbet, mint a redukált forma. Ez arra utal, hogy az újrachajtogatás során legalább egy, megfelelő diszulfidkötés jött létre.

A placenta-bikunin (7–64.)-fragmens pl-értékét ugyanazon eljárással határoztuk meg, mint a placenta-bikunin (102–159.)-fragmens pl-értékét. A placenta-bikunin (7–64.)-fragmens pl-értéke jóval magasabb volt, mint a várható érték ($pI=7,9$). A újrachajtogatódott placenta-bikunin (7–64.)-fragmens a gél katód széléig vándorolt, így ilyen körülmények között pontos pl-értéket nem tudtunk meghatározni.

Szintetikus placenta-bikunin (7–64.)-fragmens előállításának további menete

Mivel a szintetikus placenta-bikunin (7–64.)-fragmens a tisztítást és hajtogatást megelőzően esetleg nem ment át teljes védőcsoport-eltávolításon, az újrachajtogatást megismételtük, olyan protein alkalmazásával, amely biztosan teljes mértékben védőcsoportmentes volt. Placenta-bikunin (7–64.)-fragmenst lényegében ugyanúgy szintetizáltunk, hajtogatunk újra és tisztítottunk, mint azt a placenta-bikunin (102–159.)-fragmens esetében ismertettük, az alábbi módosításokkal: az újrachajtogatódás folyamata alatt a szintetikus peptidet (0,27 mg/ml) 20% DMSO-tartalmú oldatban,

30 órán át, 25 °C-on kevertük, és a C-18 reverz fázisú HPLC-eljárással történő tisztítást 0,1% TFA-t tartalmazó, 22,5–50% lineáris acetonitrilgradienssel végeztük, 40 percen át, 1 ml/perc átfolyási sebesség mellett.

A tisztított, redukált peptidvégtermék $MH^+=6567,5$ molekulatömegűnek bizonyult, ami jól egyezett az alábbi szekvencia alapján számított értékkel:

IHDFCLVSKV VGRCRASMPR WWYNVTDGSC QLFVYGGCDG NSNNYLTKEE CLKKCATV
(4. azonosító számú szekvencia).

Az újrarahajtogatódás és a tisztítás funkcionális Kunitz-domént eredményezett, amely tripszinhibitor-aktivitást mutatott (lásd az alábbi 2B. táblázatot). 10

2B. táblázat

Szintetikus placenta-bikunin (7–64.)-fragmens izolálására szolgáló tisztítási eljárás menete

Tisztítási lépés	Térfogat (ml)	mg/ml	mg	Egység (U)	Specifikus aktivitás (U/mg)	Hatásfok
8,0 mol/l urea	4,9	2,1	10,5	0	0	–
20% DMSO	39,0	0,27	10,5	236 000	22 500	100
Kallikrein affinitás (pH=2)	14,5	0,3	0,43	120 000	279 070	50,9
C18 RP-HPLC	0,2	1,2	0,24	70 676	294 483	30,0

A tisztított, újrarahajtogatódott protein $MH^+=6561,2$ molekulatömegűnek bizonyult, azaz 6,3 tömegegységértékkel kevesebbnek, mint a redukált peptid. Ez arra utal, hogy az újrarahajtogatódás a várható három diszulfidkötés kialakulásához vezetett.

Az újrarahajtogatódott placenta-bikunin (7–64.)-fragmens pI -értékét a placenta-bikunin (102–159.)-fragmens pI -értékének meghatározásánál ismertettek szerint végeztük. Az újrarahajtogatódott placenta-bikunin (7–64.)-fragmens pI -értéke 8,85 volt, enyhén magasabb, mint a várható érték ($pI=7,9$).

3. példa

Funkcionális placenta-bikunin (102–159.)-fragmens in vitro specifikitása

Proteázok: Szarvasmarhatripszin, humán plazmin és szarvasmarha hasnyálmirigy kallikrein mennyiségét aktívhely-titrálással határoztuk meg, *p*-nitro-fenil-*p*'-guanidino-benzoát-HCl alkalmazásával, ismert eljárás szerint [Chase, T. és Shaw, E.: *Methods Enzimol.* 19, 20–27 (1970)]. A humán kallikrein mennyiségét aktívhely-titrálással határoztuk meg, standardként szarvasmarha-aprotinin, szubsztrátként PFR-AMC-reagens alkalmazásával, 1:1 arányú komplexképződést feltételezve. Az egyes enzimeknél alkalmazott körülmények mellett a GPK-AMC-reagens K_m -értéke tripszinre vonatkoztatva 29 $\mu\text{mol/l}$, plazminra vonatkoztatva 726 $\mu\text{mol/l}$ volt; a PFR-AMC-reagens K_m -értéke humán plazmakallikreinre vonatkoztatva 457 $\mu\text{mol/l}$, szarvasmarha hasnyálmirigy kallikreinre vonatkoztatva 81,5 $\mu\text{mol/l}$ volt; az AAPR-AMC-reagens K_m -értéke elasztáz esetében 1600 $\mu\text{mol/l}$ értékűnek bizonyult. Humán szöveti kallikrein (Bayer, Németország) mennyiségi meghatározását aktívhely-titrálással végeztük, *p*-nitro-fenil-*p*'-guanidino-benzoát-HCl alkalma-

zásával, ismert eljárás szerint [Chase, T. és Shaw, E.: *Methods Enzimol.* 19, 20–27 (1970)].

Gátlási kinetika: A placenta-bikunin (102–159.)-fragmens és az aprotinin tripszint gátló képességét úgy határoztuk meg, hogy 50 pmol/l tripszint placenta-bikunin (102–159.)-fragmenssel (0–2 nmol/l) vagy aprotininnel (0–3 nmol/l) inkubáltunk, „A” jelzésű pufferben, 1,0 ml össztérfogatban. Öt (5) percre, 37 °C-on végzett inkubálást követően az elegyhez 15 μl mennyiségű, 2 mmol/l koncentrációjú GPK-AMC-reagenst adtunk, és (mint fent) regisztráltuk a fluoreszcenciaváltozást. A humán plazminnak placenta-bikunin (102–159.)-fragmenssel és aprotininnel történő gátlhatóságát úgy vizsgáltuk, hogy plazmint (50 pmol/l) placenta-bikunin (102–159.)-fragmenssel (0–10 nmol/l) vagy aprotininnel inkubáltunk; 50 mmol/l Tris-HCl-ot (pH=7,5), 0,1 mol/l NaCl-ot és 0,02% Triton-X-100-at tartalmazó pufferben. Öt (5) percre tartó, 37 °C-on történő inkubálást követően az elegyhez 25 μl mennyiségben, 20 mmol/l koncentrációjú GPK-AMC-reagenst adtunk, majd regisztráltuk a fluoreszcenciaváltozást. A humán plazmakallikreinnek placenta-bikunin (102–159.)-fragmenssel vagy aprotininnel történő gátlhatóságát úgy vizsgáltuk, hogy kallikreint (2,5 nmol/l) placenta-bikunin (102–159.)-fragmenssel (0–3 nmol/l) vagy aprotininnel (0–45 nmol/l) inkubáltunk, 50 mmol/l Tris-HCl-ot (pH=8,0), 50 mmol/l NaCl-ot és 0,02% Triton-X-100-at tartalmazó pufferben. Öt (5) percre, 37 °C-on végzett inkubálást követően az elegyhez 15 μl mennyiségben 20 mmol/l koncentrációjú PFR-AMC-reagenst adtunk, majd regisztráltuk a fluoreszcenciaváltozást. A szarvasmarha hasnyálmirigy kallikreinnek placenta-bikunin (102–159.)-fragmenssel és aprotininnel történő gátlhatóságát hasonló eljárással vizsgáltuk, kallikrein (92 pmol/l) és placenta-bikunin (102–159.)-fragmens

(0–1,6 nmol/l) vagy aprotinin (0–14 pmol/l) alkalmazásával, 100 μ mol/l szubsztrát-végkoncentráció mellett. A K_i^* gátlási konstanst „Enzfitter software” (Biosoft, Cambridge, UK) nemlineáris regressziós adatanalizáló programcsomag alkalmazásával határoztuk meg. Az egyes kísérletekben kapott kinetikai adatokat az alábbi, erősen kötődő inhibitor jelenlétét feltételező képlet alapján analizáltuk:

$$V_i/V_o = 1 - (E_o + I_o + K_i^* - [(E_o + I_o + K_i^*)^2 - 4E_o I_o]^{1/2}) / 2E_o \quad (2.);$$

ahol V_i/V_o frakcionális enzimaktivitást jelöl (a gátolt enzim arányát a nem gátolt enzim arányához viszonyítva); E_o az enzim összkoncentrációja, I_o pedig a gátlóanyag végkoncentrációja. A K_i -értékeket úgy kaptuk, hogy a szubsztrát hatását figyelembe vevő korrekciót végeztünk, az alábbi képlet alapján:

$$K_i = K_i^* / (1 + [S_o] / K_m); \quad (3.)$$

[Boudier, C., és Bieth, J. G.: Biochim. Biophys. Acta 995, 36–41 (1989)].

Humán neutrofil-elasztáz placenta-bikunin (102–159.)-fragmenssel és aprotininrel történő gátlóhatóságának vizsgálatához elasztázt (19 nmol/l) inkubáltunk placenta-bikunin (102–159.)-fragmenssel (150 nmol/l) vagy aprotininrel (0–7,5 μ mol/l), 0,1 mol/l Tris-HCl puffert (pH=8,0) és 0,05% Triton-X-100-detergenst tartalmazó pufferben. Öt percig, 37 °C-on történő inkubálást követően AAPM-AMC-reagenst adtunk az elegyhez (500 mmol/l vagy 1000 μ mol/l végkoncentrációban), majd két percen át mértük a fluoreszcencia változását. A K_i -értékeket az $1/V$ -értékeket az $[I]$ -értékek függvényében ábrázoló Dixon-görbével határoztuk meg, két különböző szubsztrátkoncentráció alkalmazása mellett [Dixon és munkatársai: (1979)].

A humán szöveti kallikreinnek aprotininrel, placenta-bikunin (7–64.)-fragmenssel vagy placenta-bikunin (102–159.)-fragmenssel történő gátlását úgy vizsgáltuk, hogy 0,35 nmol/l humán szöveti kallikreint placenta-bikunin (7–64.)-fragmenssel (0–40 nmol/l) vagy placenta-bikunin (102–159.)-fragmenssel (0–2,5 nmol/l) vagy aprotininrel (0–0,5 nmol/l) inkubáltunk, 1 ml térfogatú, alábbi összetételű reakcióelegyben: 50 mmol/l Tris-HCl (pH=9,0), 50 mmol/l NaCl és 0,1% Triton-X-100. Öt percen át, 37 °C-on történő inkubálást követően 5 μ l mennyiségű, 2 mmol/l koncentrációjú PFR-

AMC-reagenst adtunk az elegyhez (10 μ mol/l végkoncentrációban), és regisztráltuk a fluoreszcenciaváltozást. A PFR-AMC-reagens K_m -értéke humán szöveti kallikrein proteázra vonatkoztatva, az alkalmazott körülmények mellett 5,7 μ mol/l volt. Humán Xa-faktornak (American Diagnostica Inc, Greenwich, CT) szintetikus placenta-bikunin (102–159.)-fragmenssel, rekombináns placenta-bikuninproteinnel, valamint aprotininrel történő gátlóhatóságát úgy vizsgáltuk, hogy humán Xa-faktort (0,87 nmol/l) emelkedő mennyiségű gátlóanyaggal inkubáltunk, 20 mmol/l Tris-HCl-ot (pH=7,5), 0,1 mol/l NaCl-ot és 0,1% szarvasmarha-szérumalbumint tartalmazó pufferben. Öt percen át, 37 °C-on történő inkubálást követően az elegyhez 30 μ l mennyiségű, 20 mmol/l koncentrációjú LGR-AMC-reagenst (Sigma) adtunk, majd regisztráltuk a fluoreszcenciaváltozást. Kunitz-inhibitorok humán urokinázt gátló képességét úgy vizsgáltuk, hogy urokinázt (2,7 ng) inkubáltunk a kérdéses gátlóanyaggal, 1 ml össztérfogatban, 50 mmol/l Tris-HCl-ot (pH=8,0), 50 mmol/l NaCl-ot és 0,1% Triton-X-100-at tartalmazó pufferben. Öt percen át, 37 °C-on történő inkubálást követően az elegyhez 35 μ l mennyiségű, 20 mmol/l koncentrációjú GGR-AMC-reagenst adtunk (Sigma), majd regisztráltuk a fluoreszcenciaváltozást. A Xla-faktor (Enzyme Research Labs, Southbend, IN) gátlását úgy vizsgáltuk, hogy 0–800 nmol/l placenta-bikunin (7–64.)-proteint, vagy 0–140 nmol/l placenta-bikunin (102–159.)-proteint, vagy 0–40 μ mol/l aprotinint inkubáltunk 50 mmol/l Hepes-t (pH=7,5), 100 mmol/l NaCl-ot, 2 mmol/l $CaCl_2$ -ot, 0,01% Triton-X-100-at és 1% szarvasmarha-szérumalbumint tartalmazó pufferben, 1 ml össztérfogatban. Öt percen át, 37 °C-on történő inkubálást követően az elegyhez 10 μ l mennyiségű, 40 mmol/l töménységű Boc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-AMC reagenst (Bachem Biosciences, King of Prussia, PA) adtunk és regisztráltuk a fluoreszcenciaváltozást.

Eredményeink: Placenta-bikunin (102–159.)-fragmens és aprotinin gátlási profiljának közvetlen összehasonlítását úgy végeztük, hogy azonos körülmények mellett meghatároztuk azok gátlási konstans értékeit különböző proteázokkal szemben. A K_i -értékeket az alábbi 3. táblázatban ismertetjük.

3. táblázat
Különböző proteázok bikunin (102–159.)-fragmenssel és aprotininrel történő gátlására vonatkozó K_i -értékek

Proteáz (koncentráció)	Bikunin (102–159.) K_i (nmol/l)	Aprotinin K_i (nmol/l)	Szubsztrát (koncentráció)	K_m (mmol/l)
Tripszin (48,5 pmol/l)	0,4	0,8	GPK-AMC (0,03 mmol/l)	0,022
Kimotripszin (5 nmol/l)	0,24	0,86	AAPF-pNA (0,08 mmol/l)	0,027
Szarvasmarha hasnyálmirigy kallikrein (92,0 pmol/l)	0,4	0,02	PFR-AMC (0,1 mmol/l)	0,08
Humán plazmakallikrein (2,5 nmol/l)	0,3	19,0	PFR-AMC (0,3 mmol/l)	0,46

3. táblázat (folytatás)

Proteáz (koncentráció)	Bikunin (102–159.) K _i (nmol/l)	Aprotinin K _i (nmol/l)	Szubsztrát (koncentráció)	K _m (mmol/l)
Humán plazmin (50 pmol/l)	1,8	1,3	GPK-AMC (0,5 mmol/l)	0,73
Humán neutrofil elasztáz (19 nmol/l)	323,0	8500,0	AAPM-AMC (1,0 μmol/l)	1,6
XIIa-faktor	>300,0	12 000,0	PFR-AMC (0,2 μmol/l)	0,35
Humán szöveti kallikrein (0,35 nmol/l)	0,13	0,004	PFR-AMC (10 μmol/l)	0,0057
Xa-faktor (0,87 nmol/l)	274	3 μmol/l koncentráció mellett nincs gátlás	LGR-AMC (0,6 mmol/l)	nem kimutatható
Urokináz	11 000	4 500	GGR-AMC (0,7 mmol/l)	nem kimutatható
XIa-faktor (0,1 nmol/l)	15	288	E(OBz)AR-AMC (0,4 mmol/l)	0,46

Placenta-bikunin (102–159.) és aprotinin az alkalmazott körülmények között jelentős mértékben gátolta a szarvasmarha-tripszint és humán plazmint. Az aprotinin elasztázon mért gátlási értéke K_i=8,5 μmol/l volt. Placenta-bikunin (102–159.) elasztázon mért gátlási értéke K_i=323 nmol/l volt. Placenta-bikunin (102–159.) gátlásának szarvasmarha hasnyálmirigy kallikreinen mért K_i-értéke 20-szor magasabb volt az aprotinin gátlási értékénél. Ezzel szemben placenta-bikunin (102–159.) hatásosabban gátolja a humán plazmakallikreint, mint az aprotinin, és 56-szor nagyobb affinitással kötődik.

Mivel placenta-bikunin (102–159.) a Trasylo[®]-nál több mint 50-szer hatásosabban gátolja a kallikrein proteázt, a Trasylo[®] adagjánál kisebb mennyiségű humán placenta-bikunin vagy annak fragmensei [például placenta-bikunin (102–159.)] szükségesek a gátlószer KIU („Kunitz International Unit”, Kunitz Nemzetközi Egység) érték szerinti hatásos dózisszintjének fenntartásához. Ez csökkenti a gyógyászati készítmény adagokénti költségeit, valamint csökkenti annak valószínű-

nőségét, hogy a gyógyászati készítménnyel kezelt egyéneknél ismételt alkalmazáskor vesetoxikus tünetek alakuljanak ki. Továbbá mivel a találmány szerinti protein humán eredetű, emberben kevésbé immunogén, mint az aprotinin, amely szarvasmarha-eredetű. Ez azt eredményezi, hogy lényegesen csökken a káros immunológiai következmények kockázata a gyógyászati készítmény ismételt alkalmazása esetén.

4. példa

Funkcionális placenta-bikunin (7–64.)-fragmens in vitro specificitása

Funkcionális placenta-bikunin (7–64.)-protein *in vitro* specificitásának vizsgálatát a fenti példákban ismertetett anyagokkal és eljárásokkal végeztük.

Eredményeink: Az alábbi 4A. táblázat placenta-bikunin (7–64.)-protein *in vitro* gátlóaktivitását mutatja, különböző szerinproteázokon vizsgálva. Az adatokat placenta-bikunin (102–159.) és aprotinin (Trasylo[®]) vizsgálata során kapott gátlási értékekkel hasonlítottuk össze.

4A. táblázat

Bikunin (7–64.) K_i-értékei, különböző proteázokon vizsgálva

Proteáz (koncentráció)	Bikunin (7–64.) K _i (nmol/l)	Aprotinin K _i (nmol/l)	Bikunin (102–159.) K _i (nmol/l)
Tripszin (48,5 pmol/l)	0,17	0,8	0,4
Szarvasmarha hasnyálmirigy kallikrein (92,0 pmol/l)	0,4	0,02	0,4
Humán plazmakallikrein (2,5 nmol/l)	2,4	19,0	0,3
Humán plazmin (50 pmol/l)	3,1	1,3	1,8
Szarvasmarha-kimotripszin (5 nmol/l)	0,6	0,9	0,2
XIIa-faktor	>300	12 000	>300
Elasztáz	>100	8 500	323

Az eredmények azt mutatják, hogy placenta-bikunin (7–64.)-fragmenst kódoló aminosavszekvencia újrarahajtogatható oly módon, hogy aktív szerinproteáz-gátló anyagot kapjunk, amely legalább négy, tripszinszerű szerinproteázzal szemben hatásos.

Az alábbi 4B. táblázat újrarahajtogatózott placenta-bikunin (7–64.)-fragmens különböző szerinproteázokra

kifejtett *in vitro* gátlási hatékonyságát mutatja. Újrarahajtogatózott placenta-bikunin (7–64.)-fragmenst olyan proteinekből állítottunk elő, amely a tisztítást és újrarahajtogatást megelőzően biztosan teljes deprotekción ment át. Az adatokat placenta-bikunin (102–159.) és aprotinin (Trasylo[®]) vizsgálata során kapott gátlási értékekkel hasonlítottuk össze.

4B. táblázat

Újrarahajtogatózott bikunin (7–64.) K_i-értékei különböző proteázokon vizsgálva

Proteáz (koncentráció)	Bikunin (7–64.) K _i (nmol/l)	Aprotinin K _i (nmol/l)	Bikunin (102–159.) K _i (nmol/l)
Tripszin (50 pmol/l)	0,2	0,8	0,3
Humán plazmakallikrein (0,2 nmol/l)	0,7	19,0	0,7
Humán plazmin (50 pmol/l)	3,7	1,3	1,8
XIIa-faktor	nincs adat	12 000	4 500
XIa-faktor (0,1 nmol/l)	200	288	15
Humán szöveti kallikrein	2,3	0,004	0,13

Meglepetésünkre, placenta-bikunin (7–64.) hatékonyabban gátolta a humán kallikreint, mint az aprotinin, és legalább olyan hatékonyságúnak bizonyult, mint plazmingátló anyag. Ezek az adatok arra utalnak, hogy placenta-bikunin (7–64.) legalább olyan hatásos *in vitro* vizsgálatok szerint, mint az aprotinin, és *in vivo* jobb, vagy hasonló hatékonyságú lehet.

5. példa

Placenta-bikunin (102–159.)-variáns expressziója élesztőben

A placenta-bikunin (102–159.)-fragmenst (6. azonosító számú szekvencia) szintetikus oligonukleotidok alkalmazásával állítottuk elő. A végső DNS-termék (5'–3' irányban) a következőket tartalmazta: az élesztő α párosodási faktora („α-mating factor”) propeptidszekvenciájának 15 nukleotidját, placenta-bikunin (102–159.)-

GAA GGG GTA AGC TTG GAT AAA AGA TAT GAA GAA TAC TGC ACC GCC
AAC GCA GTC ACT GGG CCT TGC CGT GCA TCC TTC CCA CGC TGG TAC
TTT GAC GTG GAG AGG

(42. azonosító számú szekvencia).

A következő szekvenciájú, klónozást megkönnyítő BamHI-helyet és stopkodont tartalmazó, 3'-végi antiszensz oligonukleotidot szintetizáltuk:

CGC GGA TCC CTA CTG GCG GAA GCA GCG GAG CAT GCA GGC CTC CTC
AGA GCG GTA GCT GTT CTT ATT GCC CCG GCA GCC TCC ATA GAT GAA
GTT ATT GCA GGA GTT CCT CTC CAC GTC AAA GTA CCA GCG

(43. azonosító számú szekvencia).

Az oligonukleotidokat 1 mmol/l EDTA-t tartalmazó, 10 mmol/l Tris-pufferben oldottuk (pH=8,0), az egyes oligonukleotidok 12-12 μg mennyiségét elegyítettük, és az oldat NaCl-koncentrációját 0,25 mol/l-re állítottuk be. A hibridizálódást elősegítendő, az oligonukleotidokat denaturáltuk úgy, hogy azokat 5 percig for-

ragmenst kódoló cDNS-szekvenciával fuzionáltatva, úgy, hogy az az előbbi szekvenciával egyazon olvasási fázisba illeszkedjék, végül ugyancsak az előbbi olvasási fázisba illeszkedő stopkodont. A fenti cDNS, pS604 jelzésű élesztő expressziós vektorba klónozva, olyan fúziós protein expresszáldását irányítja, amely N-terminális élesztő α párosodási faktora propeptidet tartalmaz, placenta-bikunin (102–159.)-fragmens által kódolt, 58 aminosavból álló szekvenciával fuzionáltatva. A fenti fúziós proteint úgy terveztük, hogy az érési folyamaton menjen át, az „α-mating” faktor és a Kunitz-domén csatlakozási pontján található KEX-2 hasítási helyen, ami azt eredményezi, hogy a Kunitz-domén, annak natív N-terminusán szabadabbá válik.

A következő szekvenciájú, klónozást megkönnyítő HindIII-helyet tartalmazó, 5'-végi szensz oligonukleotidot szintetizáltuk:

raltuk, majd 2 órán át, 65 °C-ról szobahőmérsékletre hagytuk hűlni. A lépcsőzetes végeken a komplementer nukleotidokat Klenow-fragmens alkalmazásával megszentizáltuk, majd HindIII- és BamHI-enzimekkel emésztést végeztünk. Az így kapott, emésztett kettős szálú fragmenst pUC19-plazmidba klónoztuk,

és a klónozott szekvencia helyességét ellenőriztük. A helyes szekvenciájú fragmenst tartalmazó klónt BamHI/HindIII enzimekkel emésztettük, hogy a biku-

ninkódoló fragmenst felszabadítsuk, amely a (+)-szálnak megfelelően a következő szekvenciával rendelkezik:

GAA GGG GTA AGC TTG GAT AAA AGA TAT GAA GAA TAC TGC ACC GCC
 AAC GCA GTC ACT GGG CCT TGC CGT GCA TCC TTC CCA CGC TGG TAC
 TTT GAC GTG GAG AGG AAC TCC TGC AAT AAC TTC ATC TAT GGA GGC
 TGC CGG GGC AAT AAG AAC AGC TAC CGC TCT GAG GAG GCC TGC ATG
 CTC CGC TGC TTC CGC CAG TAG GGA TCC

(44. azonosító számú szekvencia),

amely fragmenst ezután gélen tisztítottunk, és BamHI/HindIII enzimekkel emésztett pS604-vektorba klónoztunk. A ligációs elegyet fenol/kloroform extraháltuk, és „S-200 minispin”-oszlopon tisztítottuk. A ligációs eleggyel SC101- és WHL341-élesztőtörzseket transzformáltunk, és a transzformánsokat „ura” szelekciós lemezekre kioltottuk. Mindkét törzs esetében tizenkét-tizenkét telepet „ura drop out” lemezekre szelészettünk. Különálló telepeket 2 ml ura-DO-táptalajba oltottunk, és egy éjszakán át, 30 °C-on tenyésztettünk. A sejteket 2 percig, 14 000 g mellett centrifugáltuk, és a felülúszókat arra nézve teszteltük, hogy tartalmaznak-e placenta-bikunin (102–159.)-fragmenst.

Placenta-bikunin (102–159.)-fragmens expressziójának kimutatása transzformált élesztősejtekben

Először a felülúszókat (vizsgálatonként 50 µl térfogatú mintákat) arra nézve vizsgáltuk, hogy az 1. példában ismertetett vizsgálati eljárás szerint (1 ml reakcióelegyben) képesek-e tripszin *in vitro* aktivitását gátolni. Negatív kontrollként beoltatlan tápfolyadékot és aprotinin inaktív variánsát expresszázó élesztőklónt alkalmaztunk. Pozitív kontrollként természetes aprotinint expresszázó élesztőklónt szolgált, és azt az összehasonlítás kedvéért ábrázoltuk.

A placenta-bikunin (102–159.)-fragmens expressziójának mennyiségi meghatározását más módon, a szintetikus peptiddel szemben előállított poliklonális ellenanyagok (pAb-k) alkalmazásával végeztük, amely eljárás szerint a rekombináns peptidok felhalmozódását Western-blot-lenyomatokon követtük. Ezeket a vizsgálatokat csak az SC101-törzs-eredetű rekombinánsokkal végeztük el, mivel ezek nagyobb gátlóaktivitást mutattak, mint a WHL341-törzsből származó rekombinánsok.

Poliklonális ellenanyagokat (pAb-kat) úgy állítottunk elő, hogy a 0. napon „New Zealand White” nőstény nyulakat (Hazelton Research Labs, Denver, Pa) 250 µg, tisztított, redukált, szintetikus placenta-bikunin (102–159.)-fragmenssel immunizáltunk, komplett Freund-féle adjuvánsban; majd a 14., 35. és 56. napon az állatokat emlékeztető oltásban részesítettük, 125 µg fenti antigénnel, inkomplett Freund-féle adjuvánsban. Az alábbi kísérletek során alkalmazott antiszérumot a harmadik emlékeztető oltást követően gyűjtöttük, ismert eljárások szerint. A poliklonális ellenanyagokat protein-A-oszlopon tisztítottuk az antiszérumból.

Az SC101-élesztőtörzs transzformációjával nyert 2.4 és 2.5 jelzésű klónokat (lásd 8. ábra), valamint egy aprotininkontrollt egy éjszakán át, 30 °C-on, 50 ml „ura-DO”-táptalajban szaporítottuk. A sejteket ülepítettük, és a felülúszót „Centriprep-3” koncentrációkészülék (Amicon, Beverly, MA) alkalmazásával, 100-szor bekoncentráltuk. Az egyes mintákat (30–30 µl) 10–20% tricinpufferolt SDS-PAGE-géleken futtattuk (Novex, San Diego, CA), a gyártó utasításai szerint eljárva. Duplikátumgélek egyikét ezüstoffestésre szolgáló reagenskapcsalattal előhívtuk (Integrated Separation Systems, Nantvick, MA), másikat nitro-cellulózra vittük át, és a szintetikus bikunin (102–159.)-fragmenssel szemben termelt, tisztított poliklonális ellenanyaggal hívtuk elő. Második ellenanyagként kecskében termelt, alkalis foszfatázzal konjugált antinyúl ellenanyagot alkalmaztunk, a gyártó utasításai szerint (Kirkegaard és Perry, Gaithersburg, MD).

Placenta-bikunin (102–159.)-fragmens tisztítása transzformált SC101-törzsből

Egy liter (1 l), 2.4-klónnal transzformált SC101-törzs fermentációs tápfolyadékát centrifugálással (4000×g, 30 perc) összegyűjtöttük, és 1,0 ml térfogatú anhidrokimotripszin-sepharose-oszlopra vittük fel (Takara Biochemical Inc., CA), amelyet előzőleg a következő összetételű pufferrel ekvilibráltunk: 0,1 mol/l NaCl, 2 mmol/l CaCl₂ és 0,01% (térfogat/térfogat) Triton-X-100, 50 mmol/l Hepes-pufferben (pH=7,5). Az oszlopot a fenti pufferrel egyébként megegyező összetételű, de 1,0 mol/l NaCl-ot tartalmazó pufferrel mostuk, amíg a 280 nm hullámhosszon mért fényelnyelés (A₂₈₀ nm) nullára nem csökkent; ekkor az oszlopot 0,1 mol/l hangyasavval eluáltuk (pH=2,5). Az eluált frakciókat elegyítettük, és előzőleg 0,1% TFA-val ekvilibrált C18-oszlopra vittük fel (Vydac, 5 µm, 4,6×250 mm), majd a kötődött proteineket 50 perc alatt, 0,1% TFA-ban 20–80% acetonitril tartalmazó lineáris gradienssel eluáltuk. A placenta-bikunin (102–159.)-fragmenst tartalmazó frakciókat elegyítettük, és C18-oszlopon ismételt kromatografáltuk, de az eluálást ezúttal 0,1% TFA-ban 22,5–50% acetonitril tartalmazó lineáris gradienssel végeztük.

Eredmények: A 8. ábrán a tripszinaktivitás százalékos gátlását ábrázoltuk, SC101- és WHL341-törzsek transzformációjával nyert tizenkét-tizenkét klón esetében. Eredményeink szerint mind a tizenkét, tripszininhibitor bikunin-(102–159.)-fragmenssel transzformált SC101-élesztőtörzs-eredetű klón jelentős mennyiségű

tripszininhibitor-aktivitású hatóanyagot termelt, szemben a két negatív kontrollal, amelyek egyike sem volt képes gátolni a tripszint. Az aktivitás tehát azzal hozható összefüggésbe, hogy a placenta-bikunin (102–159.)-variánsal transzformált sejtekben specifikus gátlóanyag expresszáldott. A WHL341-élesztőtörzs-eredetű minták minimális tripszininhibitor-aktivitást tartalmaztak. Ez feltehetően arra vezethető vissza, hogy a kísérletben alkalmazott feltételek mellett az említett törzs lassan szaporodott.

A 9. ábrán SC101-élesztőklónokból származó felülűszök SDS-PAGE- és Western-analízisének eredménye látható. Placenta-bikunin (102–159.)-fragmenst expresszáló, 2.4 és 2.5 jelzésű rekombináns élesztőklónok, valamint aprotinint expresszáló élesztőklón felülűszöit tartalmazó, ezüstfestéssel előhívott SDS-PAGE-gélen körülbelül 6 kDa molekulatömegnek megfelelően vándorló csík volt megfigyelhető, amely méret megfelelt az egyes rekombináns Kunitz-inhibitor-domének várható méretének. Western-analízis szerint a 2.4 és 2.5 jelzésű klónok által expresszált 6 kDa csíkok reagáltak a placenta-bikunin (102–159.)-variánsal szemben előállított poliklonális ellenanyagokkal. Ugyanaz a 6 kDa méretű csík, az aprotinin esetében, nem reagált a fenti ellenanyagokkal, arra utalva, hogy az ellenanyag specifikus volt a placenta-bikunin (102–159.)-variánsra.

A placenta-bikunin C-terminális doménjét tartalmazó végső készítmény, SDS-PAGE-gél ezüstfestése szerint, nagy tisztaságú volt (10. ábra). A végső készítményben a tápfolyadékban mért tripszininhibitor-aktivitás 31%-át nyertük vissza. A tisztított inhibitor N-terminális szekvenálása szerint a protein 40%-a megfelelő érési folyamaton ment át, és placenta-bikunin (102–159.)-variánsra jellemző N-terminális véget tartalmazott, míg annak körülbelül 60%-a tartalmazta az élesztő α párosodási faktora egy részét. A tisztított termék aktív szerinproteáz-inhibitorot tartalmazott, amelyet a plazmakallikrein *in vitro* gátlása vonatkozásában 0,35 nmol/l látszólagos K_i -érték jellemzett.

5' szensz oligonukleotid:

GAAGGGGTAA GCTTGGATAA AAGAGAAGAA TACTGTACTG CTAATGCTGT
TACTGGTCCA TGTAGAGCTT CTTTCCAAG ATGGTACTTT GATGTTGAAA GA

(55. azonosító számú szekvencia);

és 3' antiszensz oligonukleotid:

ACTGGATCCT CATTGGCGAA AACATCTCAA CATAACGGCT TCTTCAGATC
TGTAAGAATT TTTATTACCT CTACAACCAC CGTAAATAAA ATTATTACAA
GAATTTCTTT CAACATCAAA GTACCATCT

(56. azonosító számú szekvencia).

A #3 konstrukció – placenta-bikunin (101–159.)-variáns élesztő kodonhasználattal kódoló szekvencia – előállítására az alábbi 5'-oligonukleotidot, és a #2. konstrukció előállítására is alkalmazott 3' antiszensz

5' szensz oligonukleotid:

GAAGGGGTAA GCTTGGATAA AAGAAATTAC GAAGAATACT GTACTGCTAA
TGCTGTTACT GGTCCATGTA GAGCTTCTTT TCCAAGATGGTACTTTGATGT
TGAAAGA

(57. azonosító számú szekvencia).

Következésképp, a fermentációs tápfolyadékban felhalmozódó peptidinhibitor-aktivitás, valamint abban a szintetikus bikunin-(102–159.)-variánsal immunokémiai rokonságban álló protein jelenlétének kimutatása, továbbá a placenta-bikunin (102–159.)-variáns izolálása a transzformált vonalak egyikéből azt bizonyította, hogy az általunk ismertett rekombináns élesztőtörzsekben placenta-bikunin expresszáldott; elsőként mutattuk ki tehát, hogy élesztők alkalmazhatók placenta-bikunin-fragmensek előállítására.

További konstrukciókat állítottunk elő a placenta-bikunin (102–159.)-variánsban található Kunitz-domén expressziós szintjének fokozása és a megfelelő N-terminális véggel rendelkező protein arányának növelése érdekében. Feltételeztük, hogy placenta-bikunin (102–159.)-variáns N-terminális aminosavai (YEEY–) olyan hasítási helyet képeznek, amelyet az élesztő a-faktor prorégióját enzimatikus úton eltávolító élesztő-eredetű KEX-2 proteáz csak kevésbé ismer fel. Ezért élesztő expressziós konstrukciókat állítottunk elő, placentaeredetű bikunin (103–159.)- (EEY N-terminális véggel rendelkező), (101–159.)- (NYEEY... N-terminális véggel rendelkező) és (98–159.)- (DMFNYYEEY... N-terminális véggel rendelkező) variánsok előállítására, hogy a KEX-2 hasítási helyet körül vevő P'-alpozíciókat módosítsuk. A rekombináns protein expressziójának fokozása érdekében, egyes alább ismertett konstrukciók előállításánál, az élesztősejtek által előnyben részesített kodonokat alkalmaztuk, az emlőssejtek által előnyben részesített kodonok helyett. Ezeket a konstrukciókat lényegében a placenta-bikunin (102–159.)-variáns (#1 konstrukció) előállításánál fent ismertett eljárás szerint állítottuk elő, de a következő módosításokkal:

A #2 konstrukció – placenta-bikunin (103–159.)-variáns élesztő kodonhasználattal kódoló szekvencia – előállítására az alábbi oligonukleotidokat alkalmaztuk, a placenta-bikunin (102–159.)-variáns expressziója céljából előállított expressziós konstrukció (#1. konstrukció) előállításánál már ismertettek szerint:

oligonukleotidot alkalmaztuk, a placenta-bikunin (102–159.)-variáns expressziója céljából előállított expressziós konstrukció (#1. konstrukció) előállításánál már ismertettek szerint:

A #4 konstrukció – placenta-bikunin (98–159.)-variáns élesztő kodonhasználattal kódoló szekvencia – előállítására az alábbi 5'-oligonukleotidot, és a #2. konstrukció előállítására alkalmazott 3' antiszensz oli-

gonukleotidot alkalmaztuk, a placenta-bikunin (102–159.)-variáns expressziója céljából előállított expressziós konstrukció (#1. konstrukció) előállításánál már ismertettek szerint:

5' szensz oligonukleotid:

GAAGGGGTAA GCTTGGATAA AAGAGATATG TTTAATTACG AAGAATACTG
TACTGCTAAT GCTGTTACTG GTCCATGTAG AGCTTCTTTT CCAAGATGGT
ACTTTGATGTTGAAAGA

(58. azonosító számú szekvencia).

A fenti cDNS-eket tartalmazó plazmidokkal SC101 jelzésű élesztőtörzset (MAT α , ura 3–52, suc 2) transzformáltunk, és a humán kodonhasználattal kódolt placenta-bikunin (102–159.)-variáns előállításánál ismertettek szerint a proteineket expresszáltattuk. Az egyes élesztőkultúrák körülbelül 250 ml térfogatú mintáját ülepítettük, és a centrifugálással (15 perc,

3000 fordulat/perc) nyert felülúszókat 1 ml térfogatú kallikrein-sepharose-oszlopokon, a fent ismertettek szerint tisztítottuk. A betöltött minta relatív tripszininhibitor-aktivitását, a kinyert tisztított protein mennyiségét és a tisztított protein N-terminális szekvenciáját meghatároztuk, és az eredményeket az alábbi, 7. táblázatban összegeztük.

7. táblázat

Placenta-bikunin C-terminális Kunitz-doménjét tartalmazó különböző proteinek termelődésének relatív szintje

Konstrukció	Relatív inhibitor-koncentráció a mintában	N-terminális szekvenálás		Megjegyzés
		mennyiség (pmol)	szekvencia	
#2 103–159.	nem kimutatható	nem kimutatható	–	nincs expresszió
#3 101–159.	25% gátlás	nem kimutatható	–	alacsony expresszió
#4 98–159. megfelelő expressziós termék	93% gátlás	910	DMFNYE–	jó
#1 102–159.	82% gátlás	480	AKEEGV–	aktív, nem megfelelő érési folyamaton átment protein

Eredményeink szerint a C-terminális Kunitz-domént tartalmazó különböző hosszúságú bikuninfragmensek, funkcionális szekretálódott proteint expresszáló képességük vonatkozásában nagymértékű eltéréseket mutatnak. A (101–159.)- és (103–159.)-fragmenseket expresszáló konstrukciók, a tisztítást megelőzően, kis vagy alacsony enzimatis aktivitást eredményeztek a felülúszókban, és a tisztított frakciók 0,05 ml térfogatú mintáinak N-terminális szekvenálását követően inhibitor nem volt kimutatható. Ezzel szemben, placenta-bikunin (102–159.)- vagy (98–159.)-fragmensek expressziója, a tisztítást megelőzően, jelentős mennyiségű proteázaktivitást eredményezett a felülúszóban. Az N-terminális szekvenálás azonban azt mutatta, hogy a (102–159.)-fragmens expressziójával nyert tisztított protein nagyobbrészt nem ment át megfelelő érési folyamaton; a protein N-terminális végének analízise szerint a preprotein nagy része az élesztő „ α -mating” faktor proszekvenciájában található helyen hasítódott. A placenta-bikunin (98–159.)-fragmens expressziójával nyert tisztított protein azonban teljes egészében a megfelelő helyen hasítódott, és korrekt N-terminális véggel rendelkezett. Továbbá a placentaeredetű bikunin (102–159.)-fragmens termelődéséhez képest közel

kétszer annyi proteint nyertünk. A placenta-bikunin (98–159.)-fragmens tehát előnyös hosszúságú, a placenta-bikunin C-terminális Kunitz-doménjának, *S. cerevisiae*-sejtek „ α -mating”-faktor pre-pro-szekvencia/KEX-2 érési rendszerével történő előállításához.

6. példa

További eljárások élesztőexpresszióra

Az R74593-klón transzlációs termékéből származó 58 aminosav hosszúságú peptidet kódoló szekvencia PCR-eljárással is amplifikálható, a TA-vektorba™ (Invitrogen, San Diego, CA) klónozott R87894–R74593 PCR-termék alapján, DNS-szekvenálást követően; vagy humán placenta cDNS alapján. Az amplifikált DNS-termék a következőket tartalmazza: az élesztő „ α -mating”-faktor vezetőszekvenciájának 19 nukleotidját, az YEEY–CFRQ (58 aminosavból álló) szekvenciát kódoló R74593-szekvenciával oly módon fuzionáltatva, hogy a transzlációs termék megfelelő olvasási fázisba illeszkedjék, miáltal (élesztő „ α -mating”-faktor)/(Kunitz-domén) fúziós proteint kapunk. A proteinszekvencia, az említetteken felül, kex-2 hasítási helyet is tartalmaz, amely biztosítja, hogy a Kunitz-domén, annak natív N-terminális végén váljon szabaddá.

A klónozást megkönnyítő HindIII-helyet tartalmazó 5' szensz oligonukleotid az alábbi szekvenciával rendelkezett:

GCCAAGCTTG GATAAAAGAT ATGAAGAAT ACTGCACCGC CAACGCA
(30. azonosító számú szekvencia).

A 3' antiszensz oligonukleotid klónozást megkönnyítő BamHI-helyet, valamint stopkodont tartalmazott, és az alábbi szekvenciával rendelkezett: 10

GGGGATCCTC ACTGCTGGCG GAAGCAGCGG AGCAT
(31. azonosító számú szekvencia).

Az élesztő expressziós vektorba klónozendó, 15
206 nukleotidból álló teljes hosszúságú cDNS-szekvencia a következő szekvenciával rendelkezett:

GCCAAGCTTGG ATAAAAGATA TGAAGAATAC TGCACCGCCA ACGCAGTCAC
TGGGCCTTGC CGTGCATCCT TCCCACGCTG GTACTTTGAC GTGGAGAGGA
ACTCCTGCAA TAAC TTCATC TATGGAGGCT GCCGGGGCAA TAAGAACAGC
TACCGCTCTG AGGAGGCCTG CATGCTCCGC TGCTTCCGCC AGCAGTGAGG
ATCCCC
(32. azonosító számú szekvencia).

PCR-amplifikációt követően a fenti DNS-t HindIII- és BamHI-enzimekkel emésztettük, és pMT15 jelzésű élesztő expressziós vektorba klónoztuk (lásd az 5 164 482 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást), amelyet előzőleg ugyancsak HindIII- és BamHI-enzimekkel emésztettünk. Az így kapott plazmidvektorral SC106 jelzésű élesztőtörzset transzformáltunk, az 5 164 482 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetettek szerint. Az URA3+ élesztőtranszformánsokat izoláltuk, és indukáló körülmények mellett tenyésztettük. A placenta-bikuninvariánsok termelődésének hatásfokát az idő folyamán a tenyészetek felülűszóiban felhalmozódott tripszininhibitor-aktivitás mennyisége alapján határoztuk meg, a fent ismertetett *in vitro* vizsgálati eljárással. A fermentációs tápfolyadékokat 30 percig, 9000 fordulat/perc mellett centrifugáltuk. Ezt követően a felülűszókat 0,4, majd 0,2 µm pórusátmérőjű filteren átszűrtük, 7,5 ms vezetőképességre hígítottuk, és az oldatok pH-ját citromsavval 3-as értékre állítottuk be.

Ezután a mintákat tételenként 200 ml „S-sepharose fast-flow” (Pharmacia) géltre abszorbeáltattuk, 50 mmol/l nátrium-citrátban (pH=3), majd 60 percig kevertük. Ezt követően a gélt 2-2 l, alábbi összetételű oldattal mostuk: 50 mmol/l nátrium-citrát (pH=3); 50 mmol/l Tris-HCl (pH=9,0); 20 mmol/l HEPES (pH=6,0). A mosott gélt megfelelő oszlopba töltöttük, és 20 mmol/l HEPES-pufferben (pH=6,0) 0–1 mol/l nátrium-kloridot tartalmazó lineáris gradienssel eluáltuk. Az *in vitro* teszt szerint tripszininhibitor-aktivitást tartalmazó eluált frakciókat elegyítettük, és tovább tisztítottuk: a) immobilizált anhidrotripszint tartalmazó oszlopon végzett kromatografálással (lényegében a 2. példában ismertetettek szerint); b) immobilizált szarvasmarha-kallikreint tartalmazó oszlopon végzett kromato-

grafálással; vagy c) szokásos kromatográfás lépések, például gélszűrés és/vagy anioncserélő kromatográfia kombinációjával.

7. példa

Natív, humán placenta-bikunin izolálása placentából, és annak jellemzése

Bikuninproteint teljes fagyasztott placentából tisztítottunk, látszólag teljes homogenitásig (Analytical Biological Services, Inc. Wilmington, DE). A placentát (740 gm) szobahőmérsékleten felolvasztottuk, 0,5–1,0 cm darabokra vágtuk, jégre tettük, és 600 ml PBS-pufferrel mostuk. A felülűszót leöntöttük, és 240 ml placentadarabot Waring-homogenizátorba vittünk át. Miután ehhez 300 ml, 0,1 mol/l NaCl-tartalmú 0,1 mol/l Tris-puffert adtunk (pH=8,0), az elegyet 2 percig, nagy sebességgel homogenizáltuk, a felülűszót 750,0 ml centrifugacsövekbe leöntöttük, és jégre tettük. A fenti eljárást addig ismételtük, amíg a teljes anyagot fel nem dolgoztuk. Az elegyített szuszpenziót 60 percig, 4 °C-on, 4400×g mellett centrifugáltuk. A felülűszót gézen átszűrtük, és a placenta-bikunint kallikrein affinitásos oszlopon tisztítottuk, amelyet úgy állítottunk elő, hogy 70 mg szarvasmarha hasnyálmirigy kallikreint (Bayer AG), kovalens módon, 5,0 ml CNBr-aktivált Sepharose-hoz (Pharmacia) kötöttünk, a gyártó utasításai szerint eljárva. Az anyagot 2,0 ml/perc átfolyási sebesség mellett az affinitásos oszlopra felvittük; 0,1 mol/l Tris (pH=8,0), 0,1 mol/l NaCl összetételű pufferrel mostuk, amíg a mosófolyadékban, 280 nm hullámhosszon fényelnyelés már nem volt kimutatható. Ezután az oszlopot 0,1 mol/l Tris (pH=8,0), 0,5 mol/l NaCl összetételű pufferrel tovább mostuk, majd az oszloptér fogat háromszorosának megfelelő térfogatú, 0,2 mol/l ecetsavval (pH=4,0) eluáltuk. A kallikrein- és

tripszininhibitor-aktivitást tartalmazó frakciókat (lásd az alábbiakban) elegyítettük, fagyasztottuk és liofilizáltuk. A placenta-bikunint gélszűrő kromatográfiával, „Beckman System Gold” HPLC-rendszerhez csatlakoztatott „Superdex-75 10/30”-oszlopon (Pharmacia) tovább tisztítottuk. Röviden, az oszlopot 0,1 mol/l Tris, 0,15 mol/l NaCl és 0,1% Triton-X-100 összetételű pufferrel, 0,5 ml/perc átfolyási sebesség mellett ekvibráltuk. A liofilizált mintát 1,0 ml, 0,1 mol/l Tris-pufferben (pH=8,0) felvettük, és 200 µl térfogatú mintákban a gélszűrő oszlopra injektáltuk. Frakciókat (0,5 ml) gyűjtöttünk, és azokat tripszin- és kallikreininhibitor-aktivitásra nézve teszteltük. Az aktív frakciókat elegyítettük, és az oldat pH-ját TFA hozzáadásával 2,5-re állítottuk be. Az anyagot közvetlenül „Vydac-C18” reverz fázisú oszlopra vittük fel (5 mikron, 0,46×25 cm), amelyet előzőleg, 0,1% TFA-ban 20% acetonitrilt tartalmazó oldattal ekvibráltunk. A szétválasztást 0,1% TFA-ban 20–80% acetonitrilt tartalmazó lineáris gradienssel végeztük, 1,0 ml átfolyási sebesség mellett, 50 perc alatt, miután előzőleg az oszlopot 20 percig, 0,1% TFA-ban 20% acetonitrilt tartalmazó oldattal mostuk. Frakciókat (1 ml) gyűjtöttünk, és azokat tripszin- és kallikreininhibitor-aktivitásra nézve teszteltük. A gátlóaktivitású frakciókat „speed-vac” koncentrációkészülékkel (Savant) koncentráltuk, és N-terminális szekvenanciaanalízisnek vetettük alá.

Funkcionális tesztek placenta-bikunin jellemzésére

Funkcionális placenta-bikunint, annak szarvasmarhatripszint és humán plazmakallikreint gátló képessége alapján azonosítottunk. A tripszininhibitor-aktivitást szobahőmérsékleten, 96 lyukú mikrotitrálólemezekon (Perkin-Elmer) határoztuk meg, Gly-Pro-Lys-Aminometil-kumarin-szubsztrát (GPK-AMC) alkalmazásával, az alábbi összetételű pufferben: 50 mmol/l Hepes (pH=7,5); 0,1 mol/l NaCl; 2,0 mmol/l CaCl₂; 0,1% Triton-X-100. A tripszin hatására keletkező kumarin mennyiségét a fluoreszcencia mérésével határoztuk meg (excitáció=370 nm, emisszió=432 nm), lemezleolvasóval felszerelt „Perkin-Elmer-LS-50B”-fluoriméterben. Tripszint (23 µg, 100 µl pufferben) 20 µl vizsgálan-

dó mintával elegyítettünk, és 10 percig, 25 °C-on inkubáltunk. A reakciót 50 µl, tesztbufferben oldott (33 µmol/l végkoncentrációjú) GPK-AMC-szubsztrát hozzáadásával indítottuk meg. Mértük a fluoreszcencia intenzitását, és az egyes frakciók %-ban kifejezett gátlóaktivitását az alábbi képlet szerint számítottuk ki:

$$\% \text{ gátlás} = 100 \times [1 - F_0/F_1];$$

ahol F₀ az ismeretlen minta fluoreszcenciája, F₁ a csak tripszint tartalmazó kontroll fluoreszcenciája.

A frakciók kallikreininhibitor-aktivitását hasonló módon állapítottuk meg, tesztbufferben [50 mmol/l Tris (pH=8,0); 50 mmol/l NaCl; 0,1% Triton-X-100] oldott 7,0 nmol/l kallikrein és 66 µmol/l Pro-Phe-Arg-AMC-szubsztrát alkalmazásával.

Placenta-bikunin in vitro specifitásának meghatározása

A natív, humán placenta-bikunin in vitro specifitását a fenti példákban ismertetett anyagok és módszerek alkalmazásával határoztuk meg. A placenta-bikunin mennyiségét aktívhely-titrálással határoztuk meg, ismert koncentrációjú tripszinnel szemben; a nem kötődött tripszinfrafrakció meghatározására GPK-AMC-szubsztrátot alkalmaztunk.

Proteinszekvenálás

Az 1 ml frakciót (C18–29-Delaria) „Speed-Vac”-készülékben 300 µl térfogatra csökkentettük, a szerves oldószer mennyiségének csökkentése céljából. Ezt követően a mintát „Hewlett-Packard” miniatűr bifázisos reakcióoszlopra vittük fel, és azt 1 ml, 2%-os trifluoecetsavval mostuk. A mintát „Hewlett-Packard” G1005A típusú proteinszekvenáló rendszerrel, Edman-degradációs eljárással szekvenáltuk. A 3,0 változatú szekvenálóeljárás és valamennyi reagens a „Hewlett-Packard” cégtől származott. A szekvenálást 50 cikluson át végeztük.

Eredményeink: Placenta-bikunint tisztítottunk, látszólag homogenitásig, kallikrein affinitásos kromatográfia, gélszűrés és reverz fázisú kromatográfia egymást követően történő alkalmazásával (lásd az egyes tisztítási lépéseket összegző alábbi táblázatot).

5. táblázat

Natív placenta-bikunin (1–179.) tisztítása

Tisztítási lépés	Térfogat (ml)	OD280 (/ml)	OD280	Egységek ^a (U)	Egységek/OD280
Placenta felülűsző	1800,0	41,7	75 060	3 000 000	40,0
Kallikrein affinitásos kromatográfia (pH=4,0)	20,0	0,17	3,36	16 000	4 880
Kallikrein affinitásos kromatográfia (pH=1,7)	10,2	0,45	4,56	12 000	2 630
Superdex-75	15,0	0,0085	0,13	3 191	24 546

a: Egy egységnek tekintettük azt a mennyiséget, amely standard vizsgálati eljárásban a tripszinaktivitás 50%-át gátolja.

A kallikrein- és tripszininhibitor-aktivitás nagyobb része pH=4,0 mellett eluálódott a kallikrein affinitásos

oszlopról. Az ezt követően végzett gélszűrő kromatográfia szerint (lásd 5. ábra) a kallikrein- és tripszininhi-

bitor-aktivitású csúcs 10–40 kDa molekulatömeg közé esett, a fentivel azonos körülmények mellett futtatott molekulatömeg-standardok alapján szerkesztett standardgörbe alapján. A reverz fázisú C18-kromatográfia (6. ábra) 4 gátlóaktivitású csúcst eredményezett, ezek közül a leghatékonyabb körülbelül 30% acetonnitrilkoncentrációnál eluálódott. A C18-oszlopról eluálódó első csúccsal (29. frakcióval) kapcsolatos aktivitás aminosavszekvenciája a placenta-bikunin következtetett aminosavszekvenciájának 1. aminosavával kezdődött (ADRRER...; 1. azonosító számú szekvencia), és megegyezett az 50 cikluson át végzett szekvenálás alapján megjósolt szekvenciával (lásd a 3. ábrán aláhúzott aminosavakat). A fenti szekvenciaszegmensben található ciszteinek, az oxidált protein szekvenálása alapján várható eredménynek megfelelően, nem voltak kimutathatóak. Az érett placenta-bikunin 11. és 20. aminosavpozícióiban található ciszteineket a későbbiekben azonosítottuk, az S-piridiletilezett protein szekvenálásával, amikor is a 11. és 20. ciklusokban PTH-piridil-etil-ciszteint nyertünk.

Érdekes módon, a szekvencia 30. aminosavpozíciójában található aszparagin „néma” volt (3. ábra), ami arra utal, hogy ez a hely feltehetően glikozilezett. A 29. frakció egy nagy mennyiségben előforduló szekvenciát eredményezett, amely placenta-bikunin szekvenciájának felelt meg, az #1 aminosavtól kezdődően (27 pmol az 1. ciklusban), valamint egy kisebb mennyiségben előforduló szekvenciát (2 pmol), amely szintén placenta-bikuninból származott, de a 6. aminosavval kezdődött (SHID...). A fentiek szerint a 29. frakcióban található szekvenált végső készítmény nagy fokban tiszta volt, és a termék nagy valószínűséggel felelőssé tehető az említett frakcióval kapcsolatos proteázinhibitor-aktivitásért (6. ábra).

A C18-kromatográfiával nyert végső placenta-bikunin-készítmény nagy tisztaságú volt, ezüstfestéssel megfestett SDS-PAGE-analízis alapján (7. ábra), ahol a protein 24 kDa látszólagos és molekulatömegnek megfelelően vándorolt, az alábbi molekulatömeg-standardokkal kalibrált 10–20%-os akrilamid-tricin-gélen (Novex, San Diego, CA): inzulin (2,9 kDa); szarvasmarhatripszin-inhibitor (5,8 kDa); lizozim (14,7 kDa); β -laktoglobulin (18,4 kDa); szénsavanhidráz (29 kDa); és ovalbumin (43 kDa). A placenta-bikunin SDS-PAGE alapján meghatározott mérete megfelel a protein teljes hosszúságú kódolószekvencia alapján következtetett méretének (4F. ábra).

Az N-terminális szekvenálással kapott, fent ismertetett eredményekkel összhangban a tisztított protein reagált placenta-bikunin (7–64.)-fragmenssel szemben előállított ellenanyagokkal, ahol az ezüstfestéssel előhívott géleken kimutatott tisztított készítmény adta csíkkal (7. ábra) megegyező molekulatömegű csíkot eredményezett (12A. ábra). Amikor azonban ugyanezt a készítményt szintetikus placenta-bikunin (102–159.)-variánsnal szemben termelt ellenanyagokkal reagáltattuk, a teljes hosszúságú proteinnek megfelelő csík nem volt megfigyelhető. Ehelyett szintetikus placenta-bikunin (102–159.)-variánsnal együtt vándorló, körülbelül

6 kDa méretű csík volt észlelhető. A fenti eredmények legkézenfekvőbb magyarázata szerint a tisztított készítmény a tisztítást követően degradálódott, az N-terminális domént tartalmazó N-terminális fragmenst és a C-terminális domént tartalmazó C-terminális fragmenst eredményezve. Feltételezve, hogy a placenta-bikunin (7–64.)-fragmenssel szemben előállított ellenanyagokkal reagáló fragmensből hiányzik a teljes hosszúságú protein C-terminális vége, a fragmens mérete (24 kDa) nagyfokú glikozileződésre utal.

A 6. táblázatban placenta-bikunin különböző szerinproteázokat *in vitro* gátló képességére vonatkozó adatokat összegeztünk. Az adatokat aprotininnal (Trasylo[®]) kapott eredményekkel hasonlítottuk össze.

6. táblázat

Placenta-bikunin, különböző proteázokat gátló képességére vonatkozó K_i -értékek

Proteáz (koncentráció)	Placenta-bikunin K_i (nmol/l)	Aprotinin K_i (nmol/l)
Tripszin (48,5 pmol/l)	0,13	0,8
Humán plazmin (50 pmol/l)	1,9	1,3

A fenti eredmények szerint természetes forrásból (humán placentából) izolált placenta-bikunin hatékonyan gátolja a tripszinszerű szerinproteázokat.

8. példa

Placenta-bikunin expressziós mintája különböző humán szövetekben és szövetekben

Northern-vizsgálatra alkalmas szöveti RNS-eket a Clontech cégtől szereztünk be; az egyes lenyomatok 2-2 μ g, humán szívből, agyból, placentából, tüdőből, májból, vázizomból, veséből és hasnyálmirigyből származó poliA-RNS-t tartalmaztak. Két különböző cDNS-próbát alkalmaztunk: 1. placenta-bikunin (102–159.)-fragmenst kódoló, gél tisztított cDNS-t; 2. a TA-klónból EcoRI-enzim-emésztéssel felszabadított és gélen tisztított, 780 bázispárból álló PCR-eredetű cDNS-t (4E. ábra). Mindegyik próbát ³²P-dCTP-vel, véletlenszerű lánccindító oligonukleotidok alkalmazásán alapuló jelölő reagenskészlettel (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indiana) jelöltük, majd a szöveti Northern lenyomatokkal hibridizáltattuk, a gyártó utasításai szerint eljárva. Autoradiogramokat állítottunk elő, Biomax-filmek, és 18 órás expozíciós idő alkalmazásával, majd a filmeket „Umax Scanner” készülékkel előhívtuk, és „Adobe Photoshop” alkalmazásával pásztáztuk.

Eredményeink: A placenta-bikunin (102–159.)-próba (11A. ábra) és egy, a placenta-bikunin mindkét Kunitz-doménjét tartalmazó nagyobb méretű próba (11B. ábra) alkalmazásával kapott szöveti expressziós minta lényegében a várákosnak megfelelően alakult. A placenta-bikunin-mRNS legnagyobb mennyiségben a placentában és a hasnyálmirigyben fordult elő. Továbbá jelentős mennyiségű ilyen mRNS-t mutattunk ki a tüdőben, agyban és vesében, míg alacsonyabb szín-

teket észleltünk a szívben és a májban; ez az mRNS nem volt kimutatható a vázizomban. A transzkriptum mérete mindegyik esetben 1,95 kilobázis volt, ami igen közel áll a placenta-bikunin, átfedő EST-k analízise, és a teljes hosszúságú cDNS klónozása alapján, fent ismertettek szerint következtetett méretéhez.

Az mRNS széles körű előfordulása különböző szövetekben arra utal, hogy a placenta-bikunin számos szövetben expresszálódik. Mivel a protein vezetőszekvenciát is tartalmaz, annak számos lehetősége van a humán immunrendszerrel történő találkozásra, ami feltételezi, hogy az immunrendszer azt saját proteinként ismeri fel. A placenta-bikunin-mRNS-expresszió széles körű szöveti elterjedtségére utal továbbá, hogy több, placenta-bikuninnal homológiát mutató EST-szekvencia (4B. ábra) humán felnőtt és gyermek agyból, humán retinából, emlőből, petefészekből, szaglóhamból és placentából származott. Következésképp, a natív humán protein beadása humán betegeknek, kevésbé valószínű, hogy immunválaszt váltana ki.

Érdekes módon, a placenta-bikunin expressziós mintája bizonyos mértékben emlékeztet a szarvasmarha-aprotininéra, amely nagy mennyiségben található szarvasmarhatüdőben és -hasnyálmirigyben. A placenta-bikunin expressziós mintájának további vizsgálata céljából RT-PCR-t végeztünk, a következő humán sejtekből származó össz-RNS alkalmazásával: nem stimulált humán köldökzsinórvéna endothelsejtek („Human Umbilical Vein Endothelial Cells”; HUVEC-sejtek); HK-2-sejtek (vese proximális tubulusból származó sejtvonal); TF-1-sejtek (eritroleukémia vonal); és forboleszter- (PMA-) stimulált, humán perifériás vér eredetű leukociták. Egy 600 bázispárból álló, placenta-bikunin kódoló cDNS-fragmens amplifikálására a következő próbákat terveztük:

CACCTGATCGCGAGACCCC (szensz; 59. azonosító számú szekvencia);

5' - CGC GTC TCG GCT GAC CTG GCC CTG CAG ATG GCG CAC GTG TGC GGC - 3'
(61. azonosító számú szekvencia).

Hasonló módon, a cDNS 3'-végén stopkodott (TAG) és BglII/XmaI helyet hoztunk létre, a következő szekvenciájú oligonukleotid alkalmazásával:

5' - CTG CCC CTT GGC TCA AAG TAG GAA GAT CTT CCC CCC GGG GGG GTG GTT CTG
GCG GGG CTG 3'
(62. azonosító számú szekvencia).

A stopkodon a placenta-bikunin kódoló szekvenciával egyazon olvasási fázisba illeszkedett, és terminációt idézett elő, a 170. pozícióban található lizin-aminosavat közvetlenül követően, ezáltal a szekvencia a feltételezett transzmembrándomént nem tartalmazó, csonka placenta-bikunin-fragmenst kódolt. A PstI- és BglII-emésztéssel nyert terméket izoláltuk, és BacPac8-vektorba klónoztuk, hogy a mindkét Kunitz-domént tartalmazó, de a feltételezett transzmembránszegmenstől közvetlenül N-terminálisan csonkított placentaeredetű bikunin (1-170.)-fragmenst expresszáltassuk.

CTGGCGGAAGCAGCGGAGCATGC (antiszensz; 60. azonosító számú szekvencia).

Az összehasonlítást úgy normalizáltuk, hogy a kísérletbe egy 800 bázispárból álló aktinfragmens amplifikációját eredményező, aktinláncindító oligonukleotidokat is beiktattunk. Míg az agarózgéleken etidiumbromiddal azonosított 800 bázispár nagyságú fragmens egyforma intenzitású volt valamennyi sávban, a 600 bázispár nagyságú placenta-bikunin-fragmens hiányzott a HUVEC-sejteknek megfelelő sávból, de jelentős mennyiségben jelen volt valamennyi egyéb sávban. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a placenta-bikunin legalább bizonyos endothelsejtekben nem expresszálódik, de bizonyos leukocitapopulációkban expresszálódik.

9. példa

Baculovirus/Sf9 expressziós rendszerből nyert, nagy tisztaságú placenta-bikunin (1-170.)-fragmens tisztítása és jellemzése

Mindkét Kunitz-domént tartalmazó, nagyméretű placenta-bikunin-fragmenst [placenta-bikunin (1-170.)] Sf9-sejtekben expresszáltattunk, az alábbiak szerint. PCR-eljárással nyert, TA-vektorba klónozott (lásd a megelőző példákban) placenta-bikunin-cDNS-t (4E. ábra) HindIII- és XbaI-enzimekkel történő emésztéssel felszabadítottunk, miáltal 5'-végi XbaI- és 3'-végi HindIII-helyekkel határolt fragmenst nyertünk. Ezt a fragmenst gélen tisztítottuk, majd M13mp19-vektorba klónoztuk (New England Biolabs, Beverly, MA). *In vitro* mutagenézissel [Kunkel T. A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488 (1985)] PstI-helyet hoztunk létre az 5'-végen, az XbaI-helytől 3'-irányban, de az ATG-starthelyet, az eredeti placenta-bikunin szignálpeptidet és az érett placenta-bikunin kódolószekvenciát kódoló szekvenciától 5'-irányban. A mutáció létrehozására az alábbi oligonukleotidot alkalmaztuk:

A bikunin expressziója Sf9-rovarsejtekben 1:1 fertőzési többszörös mellett volt optimális, amennyiben a tápfolyadékot a fertőzést követően 72 órával gyűjtöttük össze. A tápfolyadékgyűjtést követően a baculovirus-fertőzött sejtenyészetet felülúszó (2 l) pH-ját, Tris-HCl puffer hozzáadásával 8,0-es értékre állítottuk be. Bikunint kromatográfiával tisztítottunk, 5 ml térfogatú szarvasmarha hasnyálmirigy kallikrein affinitásos oszlop alkalmazásával, a 7. példában, a natív placenta-bikunin placentából történő tisztításánál már ismertettek szerint. Az eluált anyag pH-ját TFA hozzáadásával

2,5-es értékre állítottuk be, és 0,1% TFA-ban 10% acetonitrilt tartalmazó oldattal, 1 ml/perc átfolyási sebesség mellett ekvibrált C18 reverz fázisú oszlopon (1,0×25 cm) kromatografáltuk. A bikunint 40 perc alatt, 0,1% TFA-ban 10–80% acetonitrilt tartalmazó lineáris gradienssel eluáltuk. Az aktív frakciókat elegyítettük, liofilizáltuk, az alábbi összetételű pufferben feloldottuk: 50 mmol/l Hepes (pH=7,5); 0,1 mol/l NaCl; 2,0 mmol/l

CaCl₂; 0,1% Triton-X-100, és felhasználásig –20 °C-on tároltuk. A rekombináns bikunin koncentrációját aminosavanalízissel határoztuk meg.

Eredményeink: Rekombináns bikunint baculovirusfertőzött sejttenyészet felülúszójából tisztítottunk, az alábbi, 2 lépésből álló tisztítási eljárással, miáltal aktív tripszininhibitorot nyertünk (lásd az alábbi, 8. táblázatot).

8. táblázat

Rekombináns bikunin tisztítása transzformált sejttenyészet felülúszójából

Tisztítási lépés	Térfogat (ml)	OD280/ml	OD280 össz	Egységek (U)	Specifikus aktivitás (U/OD)
Felülúszó	2300,0	9,0	20 700	6 150 000	297
Kallikrein affinitásos kromatográfia	23,0	0,12	2,76	40 700	14 746
C18 reverz fázisú kromatográfia	0,4	3,84	1,54	11 111	72 150

A nyers kiindulási anyag kromatografálása immobilizált szarvasmarha hasnyálmirigy kallikreint tartalmazó affinitásos oszlopon, a protein 0,013%-ának és a jelen lévő tripszininhibitor-aktivitás 0,67%-ának szelektív izolálását eredményezte. A kiindulási anyagban jelen lévő tripszininhibitor-aktivitás nagy része immobilizált kallikreinhez nem kötődött, és nem volt kapcsolatos bikuninnal (az erre vonatkozó adatokat nem tüntettük fel). Az ezt követően végzett C18 reverz fázisú kromatográfia további ötszörös tisztítást eredményezett, 0,2%-os kinyerési hatásfokkal. A végső készítmény SDS-PAGE-eljárás szerint nagy tisztaságú volt (13. ábra), 21,3 kDa molekulatömegűnek bizonyult, és immunobloton, anti-

placenta-bikunin (102–159.)-fragmenssel szemben nyúlban termelt ellenanyagokkal reagált (az erre vonatkozó adatokat nem tüntettük fel). N-terminális szekvenálás (26 ciklus) az érett placenta-bikunin várható szekvenciájának megfelelő, az +1. aminosavval kezdődő szekvenciát eredményezett (ADRER...) (4F. ábra), jelezve, hogy az Sf9-sejtekben a szignálpeptid korrekten lehasítódott.

Az Sf9-sejtekből nyert tisztított placenta-bikunint (100 pmol) piridil-etil-alkileztük, CnBr-emésztettük, majd a kapott fragmensek izolálása nélkül szekvenáltuk. A 20 cikluson át végzett szekvenálás a következő N-terminusokat eredményezte:

Szekvencia	Mennyiség	Placenta-bikunin-aminosavak #	Szekvencia-azonosítószám
LRCFrQEN PP-PLG- - - -	21 pmol	154–168.	63. azonosító számú szekvencia
ADRERSIHD FCLSVKVVG RC	20 pmol	1–20.	64. azonosító számú szekvencia
FNYeEYCTA NAVTGPCRA SF	16 pmol	100–119.	65. azonosító számú szekvencia
Pr-Y-V-dGS-Q-F-Y-G	6 pmol	25–43.	66. azonosító számú szekvencia

Mind a négy várt fragmensnek megfelelő N-terminust megkaptuk tehát. Ez azt bizonyítja, hogy az Sf9-sejtekben expresszált protein tartalmazza a placenta-bikunin (1–170.)-fragmens teljes ektodoménszekvenciáját. Emésztetlen placenta-bikunin (1–170.)-fragmens egy további mintájának N-terminális szekvenálása (50 cikluson át) olyan aminosavszekvenciát eredményezett, amely a 30. ciklusban nem tartalmazott PTH-aminosavat (ebben a pozícióban PTH-aszparagint vártunk). Hasonló eredményre jutottunk a humán placentából származó természetes protein szekvenálásakor (7. példa); ennek magyarázata feltehetően az, hogy a fenti aminosav glikozilezett formában van, amint azt a fenti aszparagin-aminosavat körül vevő aminosavszekvencia alapján megjósoltuk. Továbbá a

fenti régióban található cisztein-aminosavak ugyancsak „némák”, összefüggésben azzal, hogy azok diszulfidhidak képzésében vesznek részt.

10. példa

Sf9-sejtekből származó tisztított placenta-bikunin gátlóképességének specifikitása

A rekombináns bikunin *in vitro* specifikitását a 3., 4. és 7. példában ismertetett anyagok és módszerek alkalmazásával határoztuk meg. Ezenfelül a bikunin humán szöveti kallikreint gátló képességét úgy határoztuk meg, hogy 0,35 nmol/l humán szöveti kallikreint és rekombináns bikunint az alábbi összetételű pufferben inkubáltunk: 50 mmol/l Tris (pH=9,0); 50 mmol/l NaCl; és 0,01% Triton-X-100. Öt (5) percig, 37 °C-on végzett in-

kubálást követően az elegyhez 5 µl, 2 mmol/l PFR-AMC-szubsztrátot adtunk, és a fluoreszcencia változását követtük.

Meghatároztuk továbbá a szöveti plazminogénaktivátor- (tPA-) gátló aktivitást, az alábbiak szerint: tPA-t (humán melanoma-sejtenyészetből származó egyszálú forma; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 2 órán át, szobahőmérsékleten, inhibitorral előinkubáltunk, 150 mmol/l NaCl-ot és 0,02% nátrium-azidot tartalmazó 20 mmol/l Tris-pufferben (pH=7,2). A reakciókat ezután úgy indítottuk meg, hogy az elegyet olyan reakciórendszerbe vittük át, amely 0,004% (térfogat/térfogat) Triton-X-100-detergenst és 0,005% (térfogat/térfogat)

nátrium-azidot tartalmazó, 28 mmol/l koncentrációjú Tris-pufferben (pH=8,5) a következő kiindulási koncentrációjú összetevőket tartalmazta: tPA (7,5 nmol/l), inhibitor: 0–6,6 µmol/l; Dile-Lpro-Larg-p-Nitro-anilin (1 mmol/l). A p-Nitro-anilin-képződést 405 nm-en mért fényelnyelés (A405 nm) alapján határoztuk meg, 37 °C-on, 2 órán át végzett inkubációt követően.

Az alábbi táblázatban a rekombináns bikunin *in vitro* gátlóképességét jellemző eredményeket összegeztük, különböző szerinproteáz-inhibitorok vonatkozásában. Az adatokat rekombináns bikunin vagy aprotinin alkalmazásával meghatározott gátlóképesség összehasonlításával tüntettük fel.

9. táblázat

Rekombináns placenta-bikunin (1–170.) és aprotinin különböző proteázokat gátló képességére vonatkozó K_i -értékek összehasonlítása

Proteáz (koncentráció)	Rekombináns bikunin K_i (nmol/l)	Aprotinin K_i (nmol/l)
Tripszin (48,5 pmol/l)	0,064	0,8
Humán plazma kallikrein (2,5 nmol/l)	0,18	19,0
Humán szöveti kallikrein (0,35 nmol/l)	0,04	0,004
Szarvasmarha hasnyálmirigy kallikrein (100 pmol/l)	0,12	0,02
Humán plazmin (50 pmol/l)	0,23	1,3
Xa-faktor (0,87 nmol/l)	180	5% gátlás, 31 µmol/l koncentrációnál
XIa-faktor (0,1 nmol/l)	3,0	288
Szöveti plazminogén aktivátor (7,5 nmol/l)	<60	6,6 µmol/l koncentrációnál nincs gátlás
VIIa szöveti faktor	800	1 µmol/l koncentrációnál nincs gátlás

A fenti eredmények szerint a rekombináns bikunin rovarsejtekben expresszáltatható, úgy, hogy legalább öt különböző szerinproteáz vonatkozásában hatékony, aktív proteázinhibítort nyerjünk. A rekombináns bikunin az aprotininnél sokkal hatékonyabbnak bizonyult humán plazmakallikreinnel, tripszinnel és plazminnal szemben. Meglepő módon a rekombináns bikunin valamennyi vizsgált enzimet sokkal hatékonyabban gátlott, mint a szintetikus eredetű bikunin-(7–64.)- és bikunin-(102–059.)-fragmensek. Eredményeink szerint tehát a rekombináns bikunin *in vitro* vizsgálati rendszerben sokkal hatékonyabb, mint az aprotinin, és várhatóan *in vivo* is hatékonyabbnak bizonyul.

Amellett, hogy meghatároztuk a rekombináns bikunin különböző specifikus proteázokkal szembeni hatékonyságát, vizsgáltuk a placenta-bikunin (1–170.)-fragmens azon tulajdonságát, hogy mennyire képes megnyújtani az aktivált parciális tromboplasztinidót („activated partial thromboplastin time”, APTT), és az így kapott adatokat összehasonlítottuk aprotinin alkalmazásával kapott hasonló aktivitásokkal. Az inhibitor 150 mmol/l NaCl-ot és 0,02% nátrium-azidot tartalmazó 20 mmol/l Tris-pufferben hígítottuk (pH=7,2), és „MLA Electra^R 800 Automatic Coagulation Timer” koagulométerbe (Medical Laboratory Automation, Inc.

Pleasantville, N. Y.) illő küvettába mértük (0,1 ml térfogatú minta). A készüléket APTT-meghatározásra állítottuk be, 300 másodperc aktivációs idővel, és duplikátum-üzemmóddal. Plazma (0,1 ml) hozzáadását követően („Specialty Assayed Reference Plasma lot 1–6–5185”, Helena Laboratories, Beaumont, TX) a reakcióelegyhez automatikus módon APTT-reagenst (Automated APTT-lot 102345”, Organon Tekina Corp., Durham, NC) és 25 mmol/l CaCl₂-ot adagoltunk, az alvadási folyamat megindítása céljából, és az alvadási időt automatikus módon meghatároztuk. Eredményeink szerint ahhoz, hogy az alvadási idő kétszeresére nőjön, körülbelül 2 µmol/l aprotinin végkoncentrációra volt szükség, de csak 0,3 µmol/l Sf9-sejt-eredetű placenta-bikuninra. A fenti adatok szerint a placenta-bikunin hatékony antikoaguláns, és gyógyszerként alkalmazható, a koaguláció intrinsic útjának kóros aktivációjával járó betegségekben.

Bár a találmány bizonyos előnyös megvalósítási módjait a szemléltetés kedvéért részletesen ismertettük, szakember számára nyilvánvaló, hogy az ismertett eljárások és készítmények, illetve kiserelések módosíthatók anélkül, hogy a találmányi gondolatától vagy oltalmi körétől eltérnénk. A találmány oltalmi körét tehát az ismertettek nem, csupán a csatolt igények korlátozzák.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Szerinproteáz-inhibitor-aktivitású, lényegében tisztított protein, amely az alábbi aminosavszekvenciák bármelyikét tartalmazza, amely szekvenciák egyes

aminosavpozíciói a 4F. ábra szerinti, natív, humán placenta-bikunin aminosavszekvenciájának megfelelően vannak számozva, amely aminosavszekvenciában a szignálpeptid eltávolításával nyert N-terminális aminosav az 1. aminosav:

ADRERSIHDF	CLVSKVVGRC	RASMPRWYIN	VDGSCQLFV	YCGDCNSNN	50
YLTKEECLKK	CATVTENATG	DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF	100
NYEEYCTANA	VTGPCRASFP	RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	CNKNSYRSEE	150
ACMLRCFRQQ	ENPPLPLGSK				170
(52. azonosító számú szekvencia);					
MAQLCGL	RRSRAFLALL	GSLLLSGVLA			-1
ADRERSIHDF	CLVSKVVGRC	RASMPRWYIN	VDGSCQLFV	YGGDCNSNN	50
YLTKEECLKK	CATVTENATG	DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF	100
NYEEYCTANA	VTGPCRASFP	RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	CNKNSYRSEE	150
ACMLRCFRQQ	ENPPLPLGSR	VVVLAGLFVM	VLILFLGASM	VYLIRVARN	200
QERALRTVWS	SGDDKEQLVK	NTYVL			225
(49. azonosító számú szekvencia);					
AGSFLAWL	GSLLLSGVLA				-1
ADRERSIHDF	CLVSKVVGRC	RASMPRWYIN	VDGSCQLFV	YGGCDGNSNN	50
YLTKEECLKK	CATVTENATG	DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF	100
NYEEYCTANA	VTGPCRASFP	RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE	150
ACMLRCFRQQ	ENPPLPLGSK	VVVLAGAVS			179
(2. azonosító számú szekvencia);					
MLR	AEADCVSRL	GSLLLSGVLA			-1
ADRERSIHDF	CLVSKVVGRC	RASMPRWYIN	VDGSCQLFV	YGGDCNSNN	50
YLTKEECLKK	CATVTENATG	DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF	100
NYEEYCTANA	VTGPCRASFP	RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE	150
ACMLRCFRQQ	ENPPLPLGSK	VVVLAGLFVM	VLILFLGASM	VYLIRVARN	200
QERALRTVWS	SGDDKEQLVK	NTYVL			225
(45. azonosító számú szekvencia);					
MAQLCGL	RRSRAFLALL	GSLLLSGVLA			-1
ADRERSIHDF	CLVSKVVGRC	RASMPRWYIN	VDGSCQLFV	YGGCDGNSNN	50
YLTKEECLKK	CATVTENATG	DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF	100
NYEEYCTANA	VTGPCRASFP	RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE	150
ACMLRCFRQQ	ENPPLPLGSK	VVVLAGLFVM	VLILFLGASM	VYLIRVARN	200
QERALRTVWS	FGD				213
(47. azonosító számú szekvencia);					
IHDF	CLVSKVVGRC	RASMPRWYIN	VDGSCQLFV	YGGCDGNSNN	50
YLTKEECLKK	CATV				64
(4. azonosító számú szekvencia);					
CLVSKVVGRC	RASMPRWYIN	VDGSCQLFV	YGGCDGNSNN		50
YLTKEECLKK	C				61
(5. azonosító számú szekvencia);					
YEEYCTANA	VTGPCRASFP	RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE	150
ACMLRCFRQ					159
(6. azonosító számú szekvencia);					
CTAKFTVVTPC	RASFPRWYFD	VERNSCNNFI	YCCRCNKNS	YRSEE	150
ACMLRC					156
(7. azonosító számú szekvencia);					
IHDF	CLVSKVVGRC	RASMPRWYIN	VDGSCQLFV	YGGCDGNSNN	50
YLTKEECLKK	CATVTENATG	DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF	75
NYEEYCTANA	VTGPCRASFP	RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE	125
ACMLRCFRQ					159
(3. azonosító számú szekvencia);					
CLVSKWGR	RASMPRWYIN	VDGSCQLFV	YGGCDGNSNN		50
YLTKEECLKK	CATVTENATG	DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF	100
NYEEYCTANA	VTGPCRASFP	RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE	150
ACMLRC					156
(50. azonosító számú szekvencia);					

ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWYIN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN	25
YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DSEDHSSDMF	75
NYEEYCTANA VTGPCRASFP RWYFDVERNS CNNFIYGGCR GNKNSYRSEE	125
ACMLRCFRQQ ENPPLPLGSK VVVLGAVS	179

(1. azonosító számú szekvencia); vagy

ADRERSIHDF CLVSKVVGRC RASMPRWYIN VTDGSCQLFV YGGCDGNSNN	50
YLTKEECLKK CATVTENATG DLATSRNAAD SSVPSAPRRQ DS	92

(8. azonosító számú szekvencia).

2. Az 1. igénypont szerinti protein, amely glikozilezett; vagy legalább egy láncon belüli cisztein-cisztein diszulfidhidat tartalmaz; vagy glikozilezett és legalább egy láncon belüli cisztein-cisztein diszulfidhidat tartalmaz.

3. Gyógyászati készítmény szerinproteáz-aktivitás gátlására, amely 1. vagy 2. igénypont szerinti proteint, valamint gyógyászatiilag elfogadható hordozóanyagot tartalmaz.

4. Izolált nukleinsavszekvencia, amely 1. igénypont szerinti proteint kódol, amely fehérje az alábbi szekvenciák bármelyikét tartalmazza: 52., 49., 2., 45., 47., 3., 50. vagy 1. azonosító számú szekvencia.

5. Autonóm replikálódó proteínexpressziós vektor, amely 1. vagy 2. igénypont szerinti proteint kódoló, és azt expresszálni képes nukleinsavszekvenciát tartalmaz.

6. *In vitro* eljárás szerinproteáz-aktivitás gátlására, *azzal jellemezve*, hogy szerinproteázt 1. vagy 2. igénypont szerinti proteinek legalább egyikének hatékony mennyiségével érintkeztetünk.

7. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti fehérje vagy a 3. igénypont szerinti gyógyászati készítmény az alábbi állapotok bármelyikének kezelésére: agyödéma, gerincvelő-ödéma, sclerosis multiplex, ischaemia, műtét körüli vérvesztés, szepszis, szепtikus sokk, fibrózis, kóros véralvadással vagy vérrögképződéssel járó betegségek, politrauma, apoplexia, cerebrális vagy szubarachnoidális bevérzés, az agy gyulladásai, a gerincvelő gyulladásai, cerebrális fertőzések, cerebrális granulomatózisok, gerincvelői fertőzések, gerincvelői granulomatózisok, nyitott szívűműtétek, gyomorkarcinómák, cervikális tumorok, emphysema kezelésére vagy azok áttéteinek megelőzésére.

8. A 7. igénypont szerinti fehérje vagy gyógyászati készítmény az alábbi állapotok bármelyikének kezelésére: agyödéma, gerincvelői ödéma, sclerosis multi-

plex, ischaemia, műtét körüli vérvesztés, szepszis, szепtikus sokk, fibrózis, kóros véralvadással vagy vérrögképződéssel járó betegségek, apoplexia, cerebrális vagy szubarachnoidális bevérzés, az agy gyulladásai, a gerincvelő gyulladásai, cerebrális fertőzések, cerebrális granulomatózisok, gerincvelői fertőzések, gerincvelői granulomatózisok vagy nyitott szívűműtétek.

9. A 7. igénypont szerinti fehérje vagy gyógyászati készítmény az alábbi állapotok bármelyikének a kezelésére: gyomorkarcinómák, cervikális tumorok vagy áttétek megelőzésére.

10. Az 1. vagy a 2. igénypont szerint fehérje alkalmazása az alábbi állapotok kezelésére alkalmas gyógyászati készítmények előállítására: agyödéma, gerincvelő-ödéma, sclerosis multiplex, ischaemia, műtét körüli vérvesztés, szepszis, szепtikus sokk, fibrózis, kóros véralvadással vagy vérrögképződéssel járó betegségek, apoplexia, cerebrális vagy szubarachnoidális bevérzés, az agy gyulladásai, a gerincvelő gyulladásai, cerebrális fertőzések, cerebrális granulomatózisok, gerincvelői fertőzések, gerincvelői granulomatózisok, nyitott szívűműtétek, gyomorkarcinómák, cervikális tumorok; vagy tumorok áttéteinek megelőzése.

11. Eljárás az 1. vagy 2. igénypontok valamelyike szerinti protein előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az előállítás során rekombináns DNS-technológiát alkalmazunk.

12. A 7. igénypont szerinti fehérje vagy gyógyászati készítmény, ahol az állapot emphysema.

13. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti fehérje vagy a 3. igénypont szerinti gyógyászati készítmény emphysema vagy emphysemaszerű betegségek kezelésére.

14. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti fehérje vagy a 3. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, ahol a fehérje a 3., 4., 5. vagy 9. táblázatban felsorolt enzimek bármelyikét gátolja.

```
R35464 GGCCGGGTCG TTTCTCGCCT GGCTGGGATC GCTGCTCCTC TCTGGGGTCC 50
ORF   P G R F S P G W D R C S S L G S 16

R35464 TGGCCGGCCG ACCGAGAACG CAGCATCCAC GACTTCTGCC TGGTGTGCGAA 100
ORF   W P A D R E R S I H D F C L V S K 33

R35464 GGTGGTGGGC AGATTCCGGG CCTCCATGCC TAGGTGGTGG TACAATGTCA 150
ORF   V V G R E R A S M P R W W Y N V T 50

R35464 CTGACGGATC CTGCCAGCTG TTTGTGTATG GGGGCTGTGA CGGAAACAGC 200
ORF   D G S C Q L F V Y G G C D G N S 66

R35464 AATAATTACC TGACCAAGGA GGAGTGCCTC AAGAAATGTG CCACTGTCCAC 250
ORF   N N Y L T K E E C L K K C A T V T 83

R35464 AGAGAATGCC ACGGGTGACC TGGCCACCAG CAGGAATGCA GCGGATTCCT 300
ORF   E N A T G D L A T S R N A A D S S 100

R35464 CTGTCCCAAG TGCTCCAGAG AGGCAGGATT CTTGAAGACC ACTTCAGCGA 350
ORF   V P S A P R R Q D S * R P L Q R 116

R35464 TATGTTTCAA NTATTGNAAG AATAATTGCA CCGNCAACGN ATT----- 393
ORF   Y V S * I * R I I A P * T * 130
```

Magyarázat:

R35464 = Az EST-R35464 nukleinsav-szekvenciája
(12. azonosítószámú szekvencia)

ORF = Az EST-R35464 nyitott olvasási fázisának transzlált szekvenciája
(13. azonosítószámú szekvencia)

1. ábra

R74593	GCAATAATTA	CCTGACCAAG	GAGGAGTGCC	TCAAGAAATG	TGCCACTGTC	50
ORF	Q * L	P D Q G	G V P	Q E M	C H C H	17
R74593	ACAGAGAATG	CCACGGGTGA	CCTGGCCACC	AGCAGGAATG	CAGCGGATTC	100
ORF	R E C	H G *	P G H Q	Q E C	S G F	33
R74593	CTCTGTCCCA	AGTCTCCCAG	AAGGCAGGAT	TCTGAAGACC	ACTCCAGCGA	150
ORF	L C P K	S P R	R Q D	S E D H	S S D	50
R74593	TATGTTCAAC	TATGAAGAAT	ACTGCACCGC	CAACGCAGTC	ACTGGGCCTT	200
ORF	M F N	Y E E Y	C T A	N A V	T G P C	67
R74593	GCCGTGCATC	CTTCCCACGC	TGGTACTTTG	ACGTGGAGAG	GAACTCCTGC	250
ORF	R A S	F P R	W Y F D	V E R	N S C	83
R74593	AATAACTTCA	TCTATGGAGG	CTGCCGGGGC	AATAAGAACA	GCTACCGCTC	300
ORF	N N F I	Y G G	C R G	N K N S	Y R S	100
R74593	TGAGGAGGCC	TGCATGCTCC	GCTGCTTCCG	CCAGCAGGAG	AATCCTCCCC	350
ORF	E E A	C M L R	C F R	Q Q E	N P P L	117
R74593	TGCCCCTTGG	CTCAAAGGTG	GTGGTTCTGG	CCGGGGCTGT	TTCGTGATGG	400
ORF	P L G	S K V	V V L A	G A V	S * W	133
R74593	TGTTGATCCT	TTTCCTGGGG	AGCNTCCATG	GTCTTACTGA	TTCCGGGTGG	450
ORF	C * S F	S W G	A S M	V L L I	P G G	150
R74593	CAAGGAGGAA	CCAGGAGCGT	GCCCTGCGGA	NCGTCTGGAG	CTTCGGAGAT	500
ORF	K E E	P G A C	P A X	R L E	L R R *	167
R74593	GACAAGGGNT					510
ORF	Q G					169

Magyarázat:

R74593 = Az EST-R74593 nukleinsav-szekvenciája
 (14. azonosítószámú szekvencia)

ORF = Az EST-R74593 nyitott olvasási fázisának transzlált szekvenciája
 (15. azonosítószámú szekvencia)

2. ábra

R35464	GGCCGGGTCGT	TTCTCGCCTG	GCTGGGA-TC	GCTGCTCCTC	TCTGGGGTCC	50
N39798			TGGGANTC	GCTGCTCCTC	TCTGGGGTCC	28
H94519	GCNGCG-CGT	TNNTCGCNT-	GCTGGGA-TC	GCTGCACCTC	TCTGGGGTCC	47
R74593 helyesbített	-----	-----	-----	-----	-----	
Konszenzus	GGCCGGGTCGT	TTCTCGCCTG	GCTGGGA-TC	GCTGCTCCTC	TCTGGGGTCC	50
Transzláció	A G S F	L A W	L G S	L L L	S G V	-3
R35464	TGGCCGGCCG	ACCGAGAACG	CAGCATCCAC	GACTTCTGCC	TGGTGTGCAA	100
N39798	TGG-CGGCCG	ACCGAGAACG	CAGCATCCAC	GACTTCTGCC	TGGTGTGCAA	77
H94519	NGG-CGGCCG	ACCGAGAACG	CAGCATCCAC	GACTTCTGCC	TGGTGTGCAA	96
R74593 helyesbített	-----	-----	-----	-----	-----	
Konszenzus	TGG-CGGCCG	ACCGAGAACG	CAGCATCCAC	GACTTCTGCC	TGGTGTGCAA	99
Transzláció	L A A D	B E B	S I H	D E C L	Y S K	15
R35464	GGTGGTGGGC	AGATTCGGGG	CCTCCATGCC	TAGGTGGTGG	TACAATGTCA	150
N39798	GGTGGTGGGC	AGATTCGGGG	CCTCCATGCC	TAGGTGGTGG	TACAATGTCA	127
H94519	GGTGGTGGGC	AGATTCGGGG	CCTCCATGCC	TAGGTGGTGG	TACAATGTCA	146
R74593 helyesbített	-----	-----	-----	-----	-----	
Konszenzus	GGTGGTGGGC	AGATTCGGGG	CCTCCATGCC	TAGGTGGTGG	TACAATGTCA	149
Transzláció	Y Y G	B C B A	S M P	R H H	X N Y T	32
R35464	CTGACGGATC	CTGCCAGCTG	TTTGTGTATG	GGGGCTGTGA	CGGAAACAGC	200
N39798	CTGACGGATC	CTGCCAGCTG	TTTGTGTATG	GGGGCTGTGA	CGGAAACAGC	177
H94519	CTGACGGATC	CTGCCAGCTG	TTTGTGTATG	GGGGCTGTGA	CGGAAACAGC	196
R74593 helyesbített	-----	-----	-----	-----GC	-----	2
Konszenzus	CTGACGGATC	CTGCCAGCTG	TTTGTGTATG	GGGGCTGTGA	CGGAAACAGC	199
Transzláció	D G S	C Q L	E Y Y G	G C D	G N S	48
R35464	AATAATTACC	TGACCAAGGA	GGAGTGCCTC	AAGAAATGTG	CCACTGTCAC	250
N39798	AATAATTACC	TGACCAAGGA	GGAGTGCCTC	AAGAAATGTG	CCACTGTCAC	227
H94519	AATAATTACC	TGACCAAGGA	GGAGTGCCTC	AAGAAATGTG	CCACTGTCAC	246
R74593 corr.	AATAATTACC	TGACCAAGGA	GGAGTGCCTC	AAGAAATGTG	CCACTGTCAC	52
Konszenzus	AATAATTACC	TGACCAAGGA	GGAGTGCCTC	AAGAAATGTG	CCACTGTCAC	249
Transzláció	N N Y L	T K E	E C L	K K C A	T V T	65
R35464	AGAGAATGCC	ACGGGTGACC	TGGCCACCAG	CAGGAATGCA	GCGGATTCCT	300
N39798	AGAGAATGCC	ACGGGTGACC	TGGCCACCAG	CAGGAATGCA	GCGGATTCCT	277
H94519	AGAGAATGCC	ACGGGTGACC	TGGCCACCAG	CAGGAATGCA	GCGGATTCCT	296
R74593 helyesbített	AGAGAATGCC	ACGGGTGACC	TGGCCACCAG	CAGGAATGCA	GCGGATTCCT	102
Konszenzus	AGAGAATGCC	ACGGGTGACC	TGGCCACCAG	CAGGAATGCA	GCGGATTCCT	299
Transzláció	E N A	T G D L	A T S	R N A	A D S S	82
R35464	CTGTCCCAAG	TGCTCCCAGA	AGGCAGGATT	CTTGAAGACC	ACTCCAGCGA	350
N39798	CTGTCCCAAG	TGCTCCCAGA	AGGCAGGATT	CT-GAAGACC	ACTCCAGCGA	326
H94519	CTGTCCCAAG	TGCTCCCAGA	AGGCAGGATT	CT-GAAGACC	ACTCCAGCGA	345
R74593 helyesbített	CTGTCCCAAG	TGCTCCCAGA	AGGCAGGATT	CT-GAAGACC	ACTCCAGCGA	151
Konszenzus	CTGTCCCAAG	TGCTCCCAGA	AGGCAGGATT	CT-GAAGACC	ACTCCAGCGA	348
Transzláció	V P S	A P R	R Q D S	E D H	S S D	98
R35464	TATGTTTCAA	NTATTGNAAG	AATAATTGCA	CCGNCAACGN	ATT-----	393
N39798	TATGTT-CAA	CTA-TG-AAG	AATACT-GCA	CCGCCAACGC	AGTCACTGGG	372
H94519	TATGTT-CAA	CTA-TG-AAG	AATACTGGCA	CCGCCAACGC	ATCACTGGG	392
R74593 helyesbített	TATGTT-CAA	CTA-TG-AAG	AATACT-GCA	CCGCCAACGC	AGTCACTGGG	197
Konszenzus	TATGTT-CAA	CTA-TG-AAG	AATACT-GCA	CCGCCAACGC	AGTCACTGGG	394
Transzláció	M F N	Y E E	Y C T	A N A	V T G	113

3. ábra

R35464	-----	-----	-----	-----	-----	
N39798	CCTTGC-GTG	GAATCCTTTC	CCACGCTGGN	AATTTNGACG	TTGAGAAGGA	421
H94519	CCT-GC-GTG	-CATCCTT-C	CCACGCTGGT	ACTTT-GNCG	-----	427
R74593 helyesbített	CCTTGCCGTG	-CATCCTT-C	CCACGCTGGT	ACTTT-GACG	TGGAGA-GGA	243
Konszenzus	CCTTGCCGTG	-CATCCTT-C	CCACGCTGGT	ACTTT-GACG	TGGAGA-GGA	440
Transzláció	P C R A	S F	P R W Y	F D V	E R N	129
R35464	-----	-----	-----	-----	-----	
N39798	AC-----	-----	-----	-----	-----	423
H94519	-----	-----	-----	-----	-----	
R74593 helyesbített	ACTCCTGCAA	TAACTTCATC	TATGGAGGCT	GCCGGGGCAA	TAAGAACAGC	293
Konszenzus	ACTCCTGCAA	TAACTTCATC	TATGGAGGCT	GCCGGGGCAA	TAAGAACAGC	490
Transzláció	S C N	N F I	Y G G C	R G N	K N S	145
R35464	-----	-----	-----	-----	-----	
N39798	-----	-----	-----	-----	-----	
H94519	-----	-----	-----	-----	-----	
R74593 helyesbített	TACCGCTCTG	AGGAGGCCTG	CATGCTCCGC	TGCTTCCGCC	AGCAGGAGAA	343
Konszenzus	TACCGCTCTG	AGGAGGCCTG	CATGCTCCGC	TGCTTCCGCC	AGCAGGAGAA	540
Transzláció	Y R S E	E A C	M L R	C F R Q	Q E N	162
R35464	-----	-----	-----	-----	-----	
N39798	-----	-----	-----	-----	-----	
H94519	-----	-----	-----	-----	-----	
R74593 helyesbített	TCCTCCCCTG	CCCCTTGGCT	CAAAGGTGGT	GGTTCTGGCC	GGGGCTGTTT	393
Konszenzus	TCCTCCCCTG	CCCCTTGGCT	CAAAGGTGGT	GGTTCTGGCC	GGGGCTGTTT	590
Transzláció	P P L	P L G S	K V V	V L A	G A V S	179
R35464	-----	-----	-----	-----	-----	
N39798	-----	-----	-----	-----	-----	
H94519	-----	-----	-----	-----	-----	
R74593 helyesbített	CGTGATGGTG	TTGATCCTTT	TCCTGGGGAG	CNTCCATGGT	CTTACTGATT	443
Konszenzus	CGTGATGGTG	TTGATCCTTT	TCCTGGGGAG	CNTCCATGGT	CTTACTGATT	640
Transzláció	* W C	* S F	S W G A	S M V	L L I	195
R35464	-----	-----	-----	-----	-----	
N39798	-----	-----	-----	-----	-----	
H94519	-----	-----	-----	-----	-----	
R74593 helyesbített	CCGGGTGGCA	AGGAGGAACC	AGGAGCGTGC	CCTGCGGANC	GTCTGGAGCT	493
Konszenzus	CCGGGTGGCA	AGGAGGAACC	AGGAGCGTGC	CCTGCGGANC	<u>GTCTGGAGCT</u>	690
Transzláció	P G G K	E E P	G A C	P A * R	L E L	212
R35464	-----	-----	-----	-----	-----	
N39798	-----	-----	-----	-----	-----	
H94519	-----	-----	-----	-----	-----	
R74593 helyesbített	TCGGAGATGA	CAAGGGNT				511
Konszenzus	<u>TCGGAGATGA</u>	CAAGGGNT				708
Transzláció	R R * Q G					217

Magyarázat:

R35464 = Az EST-R35464 nukleinsav-szekvenciája (12. azonosítószámú szekvencia)

R39798 = Az EST-N39798 nukleinsav-szekvenciája (17. azonosítószámú szekvencia)

H94519 = Az EST-H94519 nukleinsav-szekvenciája (16. azonosítószámú szekvencia)

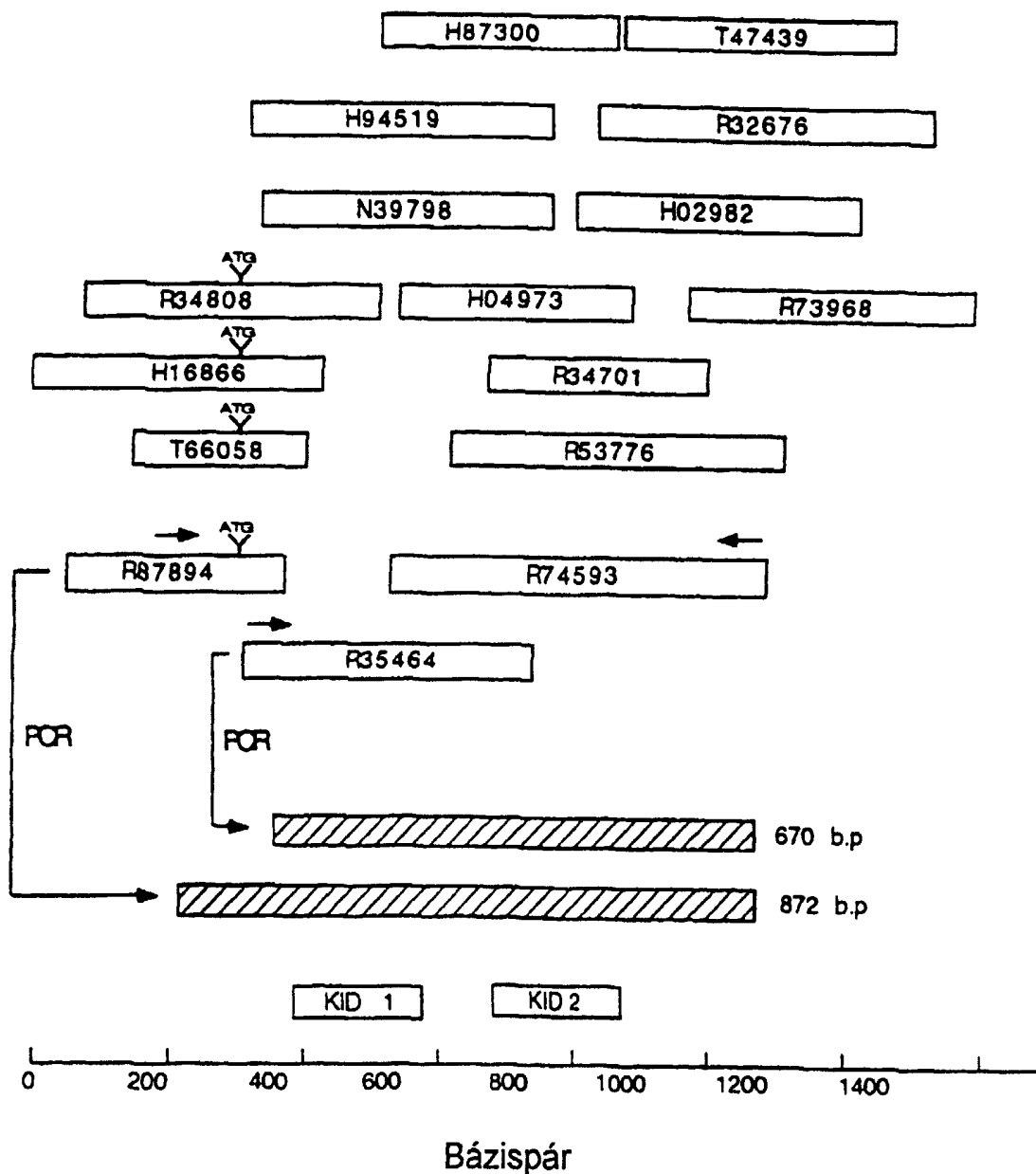
R74593-helyesbített = A 14. azonosítószámú szekvencia helyesbített változata,
a 114. pozícióban G-bázissal

Konszenzus = humán bikunin nukleinsav-szekvenciája (9. azonosítószámú szekvencia)

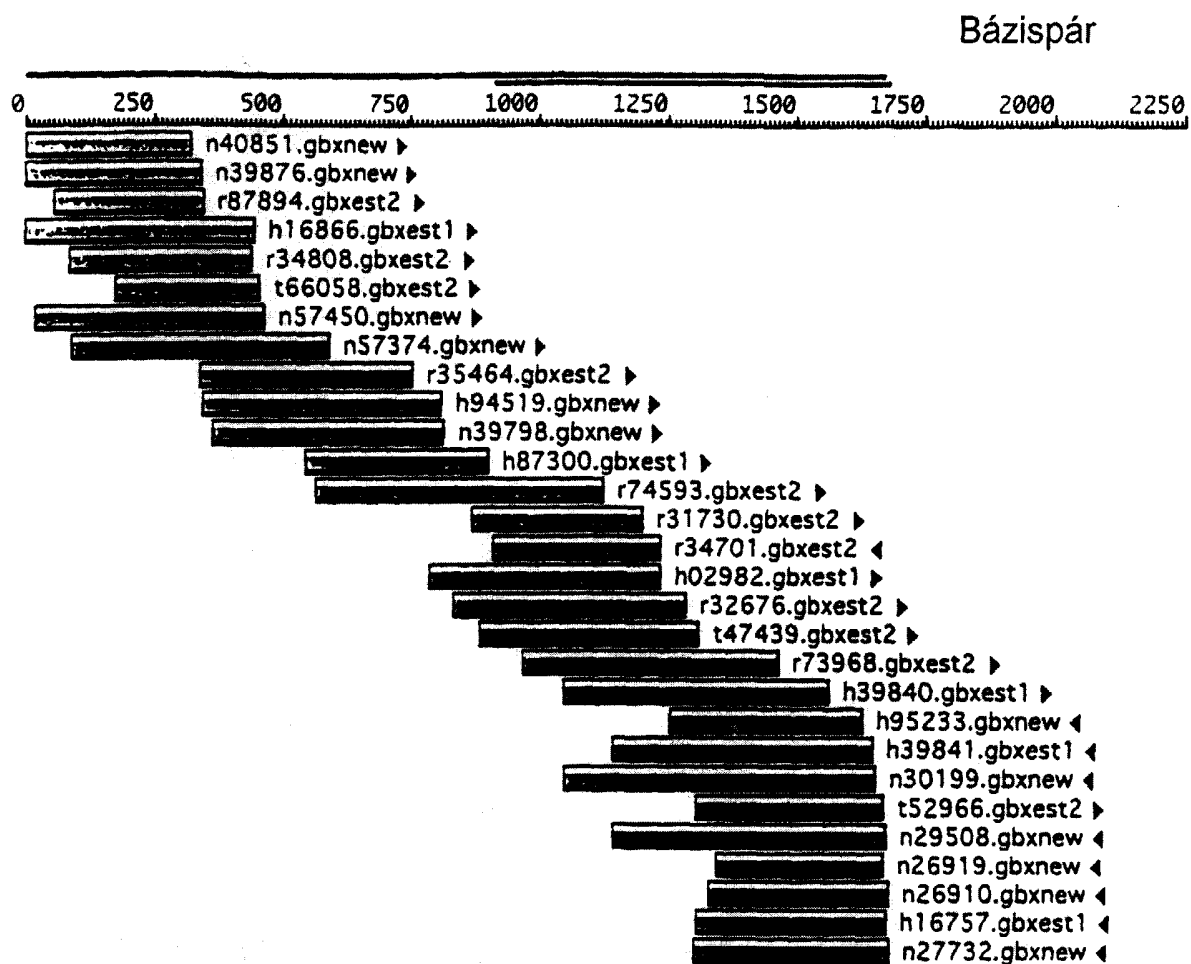
Transzláció = A konszenzus alapján transzlált aminosav-szekvencia
(10. azonosítószámú szekvencia)

3. ábra (folytatás)

Placenta-bikunint kódoló cDNS-szekvenciával homológiát mutató átfedő EST-k vázlatos ábrázolása



4A. ábra



4B. ábra

	1				50
BikuninGCGA	CCTCCGCGCG	TTGGGAGGTG	TAGCGCGGCT	CTGAACGCGT
N40851GCGA	CCTCCGCGCG	TTGGGAGGTG	TAGCGCGGCT	CTGAACGCGT
N39876GCGA	CCTCCGCGCG	TTGGGAGGTG	TAGCGCGGCT	CTGAACGCGT
R87894
H16866GGCGA	CCTCCGCGCG	TTGGGAGGTG	TAGCGCG.CT	CTGAACGGGN
R34808
T66058
N57450T	TAGCGCGGCT	CTGAACGCNA
N57374
R35464
H94519
N39798
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

4C. ábra

	51	100
Bikunin	GNA GGGCCG TTGAGTGTCC CAGGCGGCGA GGGCCGCGAGT GAGGAGCAGA	
N40851	NGAGNGGCCG TTGAGTGTCC CAGGCGGCGA GGGCCGCGAGT GAGGAGCAGA	
N39876	GCA.GGGCCG TTGAGTGTCC CAGGCGGCGA GGGCCGCGAGT GAGGAGCAGA	
R87894 TTGAGTGTNG NAGGCGGCGA GGGCCGCGAGT GAGGAGCAGA	
H16866	. .ANGGCCG TTGAGTGTCC CAGGCGGC .A GGCN.GAGT GAGGAGCAGA	
R34808G GAGGAGCAGA	
T66058	
N57450	GAAGNGGCCG TTGAGTGTCC CAGGCGGCGA GGGCCGCGAGT GAGGAGCAGA	
N57374AGA	
R35464	
H94519	
N39798	
H87300	
R74593	
R31730	
R34701	
H02982	
R32676	
T47439	
R73968	
H39840	
H95233	
H39841	
N30199	
T52966	
N29508	
N26919	
N26910	
H16757	
N27732	

4C. ábra (folytatás)

	101				150
Bikunin	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGNC	GGGC	GTCCCCACAC TGAAGGTCCG
N40851	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGNC	.GGGC	GTCCCCACAC TGAAGGTCCG
N39876	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGNC	.GGGC	NTCCCCACAC TGAAGGTCCG
R87894	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGGCCGGGC		GTCCCCACAC TGAAGGTCCG
H16866	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGNC	.GGGC	GTCCCCACAC TGAAGGTCCG
R34808	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGNC	.GGGC	GTCCCCACAC TGAAGGTCCG
T66058
N57450	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGNC	.GGGC	GTCCCCACAC TGAAGGTCCG
N57374	CCCAGGCATC	GCGCGCCGAG	AAGNC	.GGGC	GTCCCCACAC TGAAGGTCCG
R35464
H94519
N39798
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

4C. ábra (folytatás)

	151				200
Bikunin	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACCCT	CCCCGAGCGT
N40851	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACCCT	CCCCGAGCGT
N39876	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACCCT	CCCCGAGCGT
R87894	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACCCT	CCCCGAGCGT
H16866	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACG.T	CCCCGAGCN.
R34808	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACCCT	CCCCGAGCGT
T66058GGACCCT	CCCCGAGCGT
N57450	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACCCT	CCCCGAGCGT
N57374	GAAAGGCGAC	TTCCGGGGGC	TTTGGCACCT	GGCGGACCCT	CCCCGAGCGT
R35464
H94519
N39798
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

4C. ábra (folytatás)

	201			250
Bikunin	CGGCACCTGA	ACGCGAGGCC	CTCCATTGCG	CGTGCCTTTG .AGGGGCTTC
N40851	CGGCACCTGA	ACGCGAGGCC	CTCCATTGCG	CGTGCCTNTG .AGGGGCTTC
N39876	CGGCACCTGA	ACGCGAGGCC	CTCCATTGCG	CGTGCCTTTG .AGGGGCTTC
R87894	CGGCACCTGA	ACGCGAGGCC	CTCCATTGCG	CGTGCCTTTG .AGGGGCTTC
H16866	.GGCACCTGA	ACGCGAGGCC	CTCCATTGCG	CGTGCCTTTG .AGGGGCTTC
R34808	CGGCACCTGA	ACGCGAGGCC	CTCCATTGCG	CGTGCCTNTG GAGGGGCTTC
T66058	CGGCACCTGA	ACGCGAGGC.	CTCCATTGCG	.GTGCCTGTG NAGGGGCTTC
N57450	CGGCACCTGA	ACGCGAGGCC	CTCCATTGCG	CGTGCCTTTG .AGGGGCTTC
N57374	CGGCACCTGA	ACGCGAGGC.	CTCCATTGC.	CGTGCCTNG .AGGGGCTTC
R35464
H94519
N39798
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

4C. ábra (folytatás)

	251				300
Bikunin	CCGCACCT G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTGG CGTC	GC TG CGCG
N40851	CCGCACCT.G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTGG.CGTC	GCCTG.CGCG
N39876	CCGCACCT.G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTGG.CGTC	GCCTG.CGCG
R87894	CCGCACCT.G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTNG.CGTC	GC.TN.CGCG
H16866	CCGCACCT.G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTNG.CGTC	GC.TGGCGCG
R34808	CCGCACCT.G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTGGGCGTC	GC.TG.CGCG
T66058	CCGCACCT.G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTGG.CGTC	GC.TG.CGCG
N57450	CCGCACCT.G	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTGG.CGTC	GCCTG.CGCG
N57374	CCGGAACTTG	ATCGCGAGAC	CCCAACGGCT	GGTGG.CGTC	GC.TG.CGCG
R35464
H94519
N39798
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

4C. ábra (folytatás)

	301	350
Bikunin	TC TCGGCTG AGCT GGCCA TGGCGCANT	GTTGC GGGC T GAGGC GG
N40851	TC.TCGGCTG AGCT.GSNCA TGTCG	
N39876	TC.TCGGCTG AGCT.GGCCA TGGCGCACT.	G.TGGCGNGC T.GAGGC.G
R87894	TC.TCGGCTG AGCTTGGCCA TGGCGCANT.	GTTNC.GGGC T.NAGGC.GG
H16866	TTCTCGGCTG AGCT.GGCCA TGGCGCANT.	GTTGC.GNGC T.GAGGC.GG
R34808	TCTTCGGCTG AGCTGGGCCA TGGCGCANTT	GTTGC.GGGC T.GAGGC.GG
T66058	TC.TCGGCTG AGCT.GGCCA TGGCGCANT.	GTTGC.GNGC T.GAGGC.GG
N57450	TC.TCGGCTG AGCT.GGCCA TGGCGCANT.	GGTGC.GGGC TTGAGGC.GG
N57374	TCCTCGGCTG AGCT.GGCCA TGGCGCANT.	GGTGCNGC T.GAGGCCGG
R35464GGCCGG
H94519
N39798
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

4C. ábra (folytatás)

	351				400
Bikunin	AC GG CG	TTTCTCG	CC TGCTGGG	A TCGCT GC T	CCTCTCT
R87894	ACG.				
H16866	AC..CGNCGT	TTTTCTTCG.	CCTTGCTGGG	ATTCGCTTGC	TTCCTNTCTG
R34808	ACGCGGNCG.	.TTTTTCGN	CCTTGCTGGG	ATTCG.TTG.	TINCTCTCTN
T66058	...CGNCG.	.TTTTCTCG.	CC.TGCTGGG	A.TCGCT.GC	T.CCTCTCT.
N57450	ANN.NGCCG.	..TTTCTCG.	CC.TGCTGGG	A.TCGCT.GC	T.CCTCTCT.
N57374	AG..GGCCGG	..TTTCTCG.	CCTTGCTGGG	A.TCGCT.GC	T.CCTCTCTG
R35464GTCC.	..TTTCTCG.	CCTGGCTGGG	A.TCGCT.GC	T.CCTCTCT.
H94519	.GCNGCCCG.	..TTNNTCG.	CN.TGCTGGG	A.TCGCT.GC	A.CCTCTCT.
N39798CTGGG	ANTCGCT.GC	T.CCTCTCT.
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

4C. ábra (folytatás)

	401					450
Bikunin	GGGG TCCTG G	CGGCCGA	CCGA GAACG	CA GCA TCC	ACGACTT CT	
H16866	GGGGTTCCTG GG	CGGCCGA	CCGA.GAACG	CA.GCA.TCC	AAGAATTTT	
R34808	GGGGTTC.TG	GGGNGGCCGA	NCGA.GAACG	CAAGCA.TTC	ACGA.TT	
T66058	GGGG.TCCTG G.	CGGCCGA	CCGA.GAACG	CA.GCA.TCC	ACGANTT.CT	
N57450	GGGG.TCCTG G.	CGGCCGA	CCGA.GAACG	CA.GCA.TCC	ACGACTT.CT	
N57374	GGGG.TCCTG G.	CGGCCGA	NCGAAGAANG	CA.GCAATCC	ANGAATTNCT	
R35464	GGGG.TCCTG G.	CGGCCGA	CCGA.GAACG	CA.GCA.TCC	ACGACTT.CT	
H94519	GGGG.TCGNG G.	CGGCCGA	CCGA.GAACG	CA.GCA.TCC	ACGACTT.CT	
N39798	GGGG.TCCTG G.	CGGCCGA	CCGA.GAACG	CA.GCA.TCC	ACGACTT.CT	
H87300	
R74593	
R31730	
R34701	
H02982	
R32676	
T47439	
R73968	
H39840	
H95233	
H39841	
N30199	
T52966	
N29508	
N26919	
N26910	
H16757	
N27732	

4C. ábra (folytatás)

	451	500
Bikunin	GCCTGGTGT CGAAGGT GG TGGGCAGATG CCGGG CCTC CATGCCTA G	
H16866	GCC	
T66058	TCCTGGTGT CGAAGG	
N57450	GCCTGGTGT. CGAAGGT.GG TGGGCAG	
N57374	GCCTGGTGT CGAAAGTTGG TGGGCANATT CCGGGCCCTT CATGNCTAAG	
R35464	GCCTGGTGT. CGAAGGT.GG TGGGCAGATT CCGGG.CCTC CATGCCTA.G	
H94519	GCCTGGTGT. CGAAGGT.GG TGGGCAGATG CCGGG.CCTC CATGCCTA.G	
N39798	GCCTGGTGT. CGAAGGT.GG TGGGCAGATG CCGGG.CCTC CATGCCTA.G	
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

4C. ábra (folytatás)

	501				550
Bikunin	G TGGT GGT ACAATGTCAC	TGACGGATCC	TGCCAGCTGT	TTGTGT	ATG
N57374	GTTGGTGGT ANAATGTNAA	TTAANGATTG	TTGCAACTGT	TTGTGTNAT	
R35464	G. TGGT. GGT ACAATGTCAC	TGACGGATCC	TGCCAGCTGT	TTGTGT.	ATG
H94519	G. TGGT. GGT ACAATGTCAC	TGACGGATCC	TGCCAGCTGT	TTGTGT.	ATG
N39798	G. TGGT. GGT ACAATGTCAC	TGACGGATCC	TGCCAGCTGT	TTGTGT.	ATG
H87300
R74593
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

	551				600
Bikunin	GGGGCTGTGA	CGGAAACA	GCAATAATTA	CCTGACCAAG	GA GGAGTGC
N57374	GGGGCTNTTA	AACGGAAANA	.CAATAATNA	CCTGACCAA	GAAGNAAT..
R35464	GGGGCTGTGA	..CGGAAACA	GCAATAATTA	CCTGACCAAG	GA. GGAGTGC
H94519	GGGGCTGTGA	..CGGAAACA	GCAATAATTA	CCTGACCAAG	GA. GGAGTGC
N39798	GGGGCTGTGA	..CGGAAACA	GCAATAATTA	CCTGACCAAG	GA. GGAGTGC
H87300	GATTCGGCAC	AGGGGAAACA	GCAATAATTA	CCTGACCAAG	GA. GGAGTNC
R74593	GCAATAATTA	CCTGACCAAG	GA. GGAGTGC
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

4C. ábra (folytatás)

	601	650
Bikunin	CTCAAGAAAT GTGCCACTGT CACAGAGAAT GCCACGGGTG ACCTGGCCAC	
R35464	CTCAAGAAAT GTGCCACTGT CACAGAGAAT GCCACGGGTG ACCTGGCCAC	
H94519	CTCAAGAAAT GTGCCACTGT CACAGAGAAT GCCACGGGTG ACCTGGCCAC	
N39798	CTCAAGAAAT GTGCCACTGT CACAGAGAAT GCCACGGGTG ACCTGGCCAC	
H87300	CTCAAGAAAT GTGCCACTGT CACAGAGAAT GCCACGGGTG ACCTGGCCAC	
R74593	CTCAAGAAAT GTGCCACTGT CACAGAGAAT GCCACGGGTG ACCTGGCCAC	
R31730	
R34701	
H02982	
R32676	
T47439	
R73968	
H39840	
H95233	
H39841	
N30199	
T52966	
N29508	
N26919	
N26910	
H16757	
N27732	

	651	700
Bikunin	CAGCAGGAAT GCAGCGGATT CCTCTGTCCC AAGTGCTCCC AGAAGGCAGG	
R35464	CAGCAGGAAT GCAGCGGATT CCTCTGTCCC AAGTGCTCCC AGAAGGCAGG	
H94519	CAGCAGGAAT GCAGCGGATT CCTCTGTCCC AAGTGCTCCC AGAAGGCAGG	
N39798	CAGCAGGAAT GCAGCGGATT CCTCTGTCCC AAGTGCTCCC AGAAGGCAGG	
H87300	CAGCAGGAAT GCAGCGGATT CCTCTGTCCC AAGTGCTCCC AGAAGGCAGG	
R74593	CAGCAGGAAT GCAGCGGATT CCTCTGTCCC AAGTGCTCCC AGAAGGCAGG	
R31730	
R34701	
H02982	
R32676	
T47439	
R73968	
H39840	
H95233	
H39841	
N30199	
T52966	
N29508	
N26919	
N26910	
H16757	
N27732	

4C. ábra (folytatás)

	701	750
Bikunin	ATTCT GAAG ACCACTCCAG CGATATGTT	CAACTAT G AAGAATACTG
R35464	ATTCTTGAAG ACCACTTCAG CGATATGTTT	CAANTATTGN AAGAATAATT
H94519	ATTCT.GAAG ACCACTCCAG CGATATGTT.	CAACTAT..G AAGAATACTG
N39798	ATTCT.GAAG ACCACTCCAG CGATATGTT.	CAACTAT..G AAGAATACTG
H87300	ATTCT.GAAG ACCACTCCAG CGATATGTT.	CAACTAT..G AAGAATACTG
R74593	ATTCT.GAAG ACCACTCCAG CGATATGTT.	CAACTAT..G AAGAATACTG
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

	751	800
Bikunin	CACCGCCAA CGCAGT CAC TGGGCC TTG CCGTG CAT	CCTT CCCAC
R35464	GCACCGNCAA CGNATT	
H94519	GCACCGCCAA CGCATT.CAC TGGGCC..TG	C.GTG.CAT. CCTT.CCCAC
N39798	.CACCGCCAA CGCAGT.CAC TGGGGCCTTG	C.GTGAAT. CCTTTCCAC
H87300	.CACCGCCAA CGCAGTNCAC TGGGCC.TTG	C.GTGGCATN CCTT.CCCAC
R74593	.CACCGCCAA CGCAGT.CAC TGGGCC.TTG	CCGTG.CAT. CCTT.CCCAC
R31730
R34701
H02982
R32676
T47439
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

4C. ábra (folytatás)

	801	850
Bikunin	GCTGGTACTT T GACGTGGA GA GGAACTC CTG CAATAA CTCATCTAT	
H94519	GCTGGTACTT T.GNCGT	
N39798	GCTGGNAATT TNGACGTTGA GAAGGAAC	
H87300	GCTNGTACTT T.GACGTGGA GA.GGAACTC CTGGCAATAA CTCATCTAT	
R74593	GCTGGTACTT T.GACGTGGA GA.GGAACTC CTG.CAATAA CTCATCTAT	
R31730	
R34701	
H02982GA GA.GGAACTC CTG.CAATAA CTCATCTAT	
R32676G ATTC..GGAA	
T47439	
R73968	
H39840	
H95233	
H39841	
N30199	
T52966	
N29508	
N26919	
N26910	
H16757	
N27732	

	851	900
Bikunin	GGAGGCT GC CGGGGCAAT AAGAACAG C TACCGCTC T GAGGAGGCCT	
H87300	GGAGGCTTGC CGGGGCAATN AAGAACAGNT TACCGCTCTT TAGGAGGCCT	
R74593	GGAGGCT.GC CGGGGCAAT. AAGAACAG.C TACCGCTC.T GAGGAGGCCT	
R31730G.C TACCGCTC.T GAGGAGGCCT	
R34701	
H02982	GGNGGCT.GC CGGGG.AAT. AAGAACA.NC TACCGCTC.T GAGGAGGCCT	
R32676	CGAGGA..GC CGGGGCAAT. AAGAACAG.C TACCGCTC.T GAGGAGGCCT	
T47439NGGCCT	
R73968	
H39840	
H95233	
H39841	
N30199	
T52966	
N29508	
N26919	
N26910	
H16757	
N27732	

4C. ábra (folytatás)

	901	950
Bikunin	GCA TGCTC CGCTGCTTCC GC	CA GCAGGA
H87300	.GCA.T....	.
R74593	.GCA.TGCTC CGCTGCTTCC GC.....	.CA.GCAGGA
R31730	.GCA.TGCTC CGCTGCTTCC GC.....	.CA.GCAGGA
R34701TTCC GC.....	.CAAGCAGGA
H02982	.GCG.TGCTC CGCTGCTTCC GCTGTGTGTT CTCITCCAGG	CCA.GCAGGA
R32676	.GCA.TGCTC CGCTGCTTCC GC.....	.CA.GCAGGA
T47439	TGCAGTGCTC CGCTGCTTCC GC.....	.CA.GCAGGA
R73968
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732
	951	1000
Bikunin	GAA TCCTCC CCTGCCCTT GGCTCAAAGG TGGTGGTTC	TGG CGGGGC
R74593	GAA.TCCTCC CCTGCCCTT GGCTCAAAGG TGGTGGTTC	TGGCGGGGC
R31730	GAA.TCCTCC CCTGCCCTT GGCTCAAAGG TGGTGGTTC	TGG.CGGGGC
R34701	AAANTCCTCC CCTGCCCTT GGCTCAAAGG TGGTGGTTC	TGG.CGGGGC
H02982	GAA.TCCTCC CCTGCCCTT GGCTCAAAGG TGGTGGTTC	TGG.CGGGGC
R32676	GAA.TCCTCC CCTGCCCTT GGCTCAAAGG TGGTGGTTC	TGG.CGGGGC
T47439	GAA.TCCTCC CCTGCCCTT GGCTCAAAGG TGGTGGTTC	TGG.CGGGGC
R73968CGGGGC
H39840
H95233
H39841
N30199
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

4C. ábra (folytatás)

	1001		1050
Bikunin	TGTT CGTGA TGGTGTGAT CC T CTTCC TGGG AGCCT CC ATGGTC		
R74593	TGTT C CGTGA TGGTGTGAT CCTT..TTCC TGGGGAGCNT CC,ATGGTCT		
R31730	TGTT.CGTGA TGGTGTGAT CC.T.CTTCC TGGGGAGCCT CC.ATGGTC.		
R34701	TGTT.CGTGA TGGTGTGAT CCTCCTTCC CGGG.AGCCT CCCATGGTCC		
H02982	TGTT.CGTGA TGGTGTGAT CC.T.CTTCC TGGG.AGCCT CC.ATGGTN.		
R32676	TGTT.CGTGA TGGTGTGAT CC.T.CTTCC TGGG.AGCCT CC.ATGGTC.		
T47439	TGTT.CGTGA TGGTGTGAT CC.T.CTTCC TGGG.AGCCT CC.ATGGTC.		
R73968	TGTT.CGTGA TGGTGTGAT CC.T.CTTCC TGGG.AGCCT CC.ATGGTC.		
H39840		
H95233		
H39841		
N30199		
T52966		
N29508		
N26919		
N26910		
H16757		
N27732		

	1051		1100
Bikunin	TACC TGAT CCGGGTGGCA CGGAGG AAC C AGG AGCG TGCCCTGCCG		
R74593	TAC..TGATT CCGGGTGGCA AGGAGG.AAC C.AGG.AGCG TGCCCTGCCG		
R31730	TACC.TGAT. CCGGGTGGCA CGGAGGGAAC C.AGGGAGCG TGCCCTGCCG		
R34701	TACCCTGAT. CCGGGTGGCA CGGAGG.AAC CCAGG.ANCG TGCCCTGCCG		
H02982	TACC.TGAT. CCGGGTNGCA CGGAGG.AAC C.AGGGAGCG TGCCCTGCCN		
R32676	TACC.TGAT. CCGGGTGGCA CGGAGG.AAC C.AGGGAGCG TGCCCTGCCG		
T47439	TACC.TGAT. CCGGGTNGCA CGGAGG.AAC C.AGG.AGCG TGCCCTGCCG		
R73968	TACC.TGAT. CCGGGTGGCA CGGAGG.AAC C.AGG.AGCG TGCCCTGCCG		
H39840GGG.AAC C.AGG.AGCG TGCCCTGCCG		
H95233		
H39841		
N30199GAGGAACC C.ANG.AGCT TCCCTGCCG		
T52966		
N29508		
N26919		
N26910		
H16757		
N27732		

4C. ábra (folytatás)

	1101	1150
Bikunin	ACCG TCT G GAGCTCCGGA GATGACAAGG AGCAGCTGG TGAAGAAC	
R74593	ANCG.TCT.G GAGCTTCGGA GATGACAAGG GNT	
R31730	ACCG.TCTGG GAGCTCCGGA GATGACAAGG GAGCAGCTGG GTGAAGAAC.	
R34701	ACCG.TCT.G GAGCTCCGGA GATGACAAGG .AGCAGCTGG .TGAAGAAC.	
H02982	ACCG.TCTNG GAGCTCCGGA GATGACAAGG .AGCAGCTGG .TGAAGAAC.	
R32676	ACCG.TCTGG GAGCTCCGGA GATGACAAGG GAGCAGCTGG .TGAAGAAC.	
T47439	ACCG.TCT.G GAGCTCCGGA GATGACAAGG .AGCAGCTGG .TGAAGAAC.	
R73968	ACCG.TCT.G GAGCTCCGGA GATGACAAGG .AGCAGCTGG .TGAAGAAC.	
H39840	ACCGTCT.G GAGCTCCGGA GATGACAAGG .AGCAGCTGG .TGAAGAAC.	
H95233
H39841
N30199	ACCG.TCT.G GAGCTCCGGA GATNACAANG .AGCAGCTGN .TGAAGAACC	
T52966
N29508
N26919
N26910
H16757
N27732

	1151	1200
Bikunin	ACATATGT C CTGT GACCG CCCTGT CGC C AAGAGG A CT GGGGAA	
R31730	ACATATGTTC CTGTTGACCG NCCTGTTCGC C.AAGAGG.A TTGGGGGAA.	
R34701	ACATATGT.C CTGT.GACCG CCCTGT.CGC C.AAGAGG.A CT.GGGGAA.	
H02982	ACATATGT.C CTGT.GACCG NCCTGTTCGN C.AAGAGG.A CTNNGGGGAAA	
R32676	ACATATGTTC CTGTTGACCG CCCTGTTCGC C.AAGAGGGA NTGGGGGAA.	
T47439	ACATATGT.C CTGT.GACCG CCCTGT.CGC C.AAGAGG.A CT.GGGGAA.	
R73968	ACATATGT.C CTGT.GACCG CCCTGT.CGC C.AAGAGG.A CT.GGGGAA.	
H39840	ACATATGT.C CTGT.GACCG CCCTGT.CGC C.AAGAGG.A CT.NGGGAA.	
H95233
H39841C. CCCTGT.CGC CCAAAGG.A CT.GGGGAA.	
N30199	ACATATGT.C CTGT.GACCG CCCTNT.CGC C.AAGAGG.A CT.GGGNAAA	
T52966
N29508CC. CCCTNT.CGC C.AAGAGG.A CT.GGG.AA.	
N26919
N26910
H16757
N27732

4C. ábra (folytatás)

1201 1250
 Bikunin GGGAGGGG AGACTAT G TGT GA GCT TTTTTT AA A TAGA GG
 R31730 .GGGAGGGG A
 R34701 .GGGAGGGG. AGACTAT.G. TGT.GA.GCT TTTTTT..AA A.TA
 H02982 GGGGAGGGG. AGATTAT.G. TGTGA.GTT TTTTTT..AA ANTAG
 R32676 GGGGAGGGGG AGANTATTGT TGTGA.GNT TTTTTTTAAA ATTAGGAGGG
 T47439 .GGGAGGGG. AGACTAT.G. TGT.GA.GCT TTTTTT..AA A.TAGA..GG
 R73968 .GGGAGGGG. AGACTAT.G. TGT.GA.GCT TTTTTT..AA A.TAGA..GG
 H39840 .GGGAGGGG. AGACTAT.G. TGT.GA.GCT TTTTTT..AA A.TAGA..GG
 H95233
 H39841 .GGGAGGGGA AAACNAT.G. TGT.GAACCT TTTTTT.AAA A.TAGA..GG
 N30199 .GGGAGGNG. AGACTAT.G. TGT.AA.GCT TTTTTT..AA A.TAGA..GG
 T52966
 N29508 .GGGAGGGG. AGACTA..G. TGT.GA.GCT TTTTTT..AA A.TAGA..GG
 N26919
 N26910
 H16757
 N27732

1251 1300
 Bikunin GATTGACTC GGATTG A GT GATC A TTAGGG CT GAGGTCTGTT
 R32676 GNTTGANTTC GGNNTTTTNA GTTGATCCAT TTAGGGGNT GAG
 T47439 GATTGACTC .GGATTG.A GT.GATC.A. TTAGGG..CT GAGGTCTNTT
 R73968 GATTGACTC .GGATTG.A GT.GATC.A. TTAGGG..CT GAGGTCTGTT
 H39840 GATTGACTC .GGATTG.A GT.GATC.A. TTAGGG..CT GAGGTCTGTT
 H95233A. TTAGGG..CT GAGGTCTGTT
 H39841 GATTGACTC .GGATTG.A GT.GATC.A. TTAGGG..CT GAGGTCTGTT
 N30199 GATTGACTC .GGATTGGA GT.GATC.A. TTAGGG..CT GAGGTCTGTT
 T52966
 N29508 GATTGACTC .GGATTG.A GT.GATCNA. TTAGGG..CT GAGGTCTGTT
 N26919
 N26910
 H16757
 N27732

1301 1350
 Bikunin TCTCTGGGAG GTAGGACGGC TGCTTCC TG G TC TGGCA GGGATGGG
 T47439 TCTCTNGGAG GTAGGACGA
 R73968 TCTCTGGGAG GTAGGACGGC TGCTTCC.TG GGTCTTGGCA .GGGATGGG
 H39840 TCTCTGGGAG GTAGGACGGC TGCTTCC.TG G.TC.TGGCA .GGGATGGG.
 H95233 NCTCTGGGAG NTAGGACGGC TGCTTCTCTG G.TC.TGGCA .GGGATGGG.
 H39841 TCNCTGGGAG GTAGGACGGC TGCTCCCTG G.TC.TGGCA .GGGATGGG.
 N30199 TCTCTGGGAG GTAGGACGGC TGCTTCC.TG G.TC.TGGCA .GGGATGGG.
 T52966TC.TGGCA .GGGATGGG.
 N29508 TCTCTGGGAG GTAGGACGGC TGCTTCA.TG G.TC.TGGCA .GGGATGGG.
 N26919
 N26910
 H16757G G.TC.TGGCA .GGGATGGG.
 N27732CCCTG GGTCTGNCA AGGNATGGG

4C. ábra (folytatás)

1501 1550
Bikunin CTCTTTT CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT GT
H39840 CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTTGT
H95233 CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT
H39841 CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT
N30199 CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT
T52966 CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT
N29508 CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT
N26919 CTCTTTT.CN CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT
N26910 CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT
H16757 CTCTTTTACT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT
N27732 CTCTTTT.CT CATCACAGAA GTGATGTTGG AATCGTTTCT TTTGTTT.GT

1551 1600
Bikunin CTGATTTATG G TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTTT TATTAGCATT
H39840 CTGATTTATG GGTTTTTTTT AAGTAT
H95233 CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTTT TATTAGCATT
H39841 CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTTT TATTAGCATT
N30199 CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTTT TATTAGCATT
T52966 CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTTT TATTAGCATT
N29508 CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTTT TATTAGCATT
N26919 CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTTT TATTAGCATT
N26910 CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTTT TATTAGCATT
H16757 CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTTT TATTAGCATT
N27732 CTGATTTATG G..TTTTTT AAGTATAAAC AAAAGTTTTT TATTAGCATT

1601 1650
Bikunin CTGAAAGAAG GAAAGTAAAA TGTACAAGTT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC
H95233 CTGAAAGAAG GAAAGTAAAA TGTACAAGTT TAATAAA
H39841 CTGAAAGAAG GAAAGTAAAN TGTACAAGTT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC
N30199 CTGAAAGAAG GAAAGTAAAA TGTACAAGTT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC
T52966 CTGAAAGAAG GAAAGTAAAA TGTACAAGTT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC
N29508 CTGAAAGAAG GAAAGTAAAA TGTACAAGTT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC
N26919 CTGAAAGAAG GAAAGTAAAA TGTACAAGTT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC
N26910 CTGAAAGAAG GAAAGTAAAA TGTACAAGTT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC
H16757 CTGAAAGAAG GAAAGTAAAA TGTACAAGTT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC
N27732 CTGAAAGAAG GAAAGTAAAA TGTACAAGTT TAATAAAAAG GGGCCTTCCC

1651 1689
Bikunin CTTTAG AAT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
H39841 CTTTAA.
N30199 CTTTAG.AAT AAA
T52966 CTTTAGGAAT NAAAAA AAAAGGCTG
N29508 CTTTAG.AAT AAATTCAGC ATGTGCTTTC AA
N26919 CTTTAG.AAT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA A
N26910 CTTTAG.AAT AAATTCAGC ATGTGCTTTC AAAAAA
H16757 CTTTAG.AAT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA
N27732 CTTTAG.AAT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

4C. ábra (folytatás)

EST-konszenzus MLRAEADGVS RLLGSLLSG VLAADRERSI HDFCLVSKVV GRCRASMPRW 50
EST-konszenzus WYNVTDGSCQ LEVYGGCDGN SNNYLTKEEC LKKCATVTEN ATGDLATSRN 100
EST-konszenzus AADSSVPSAP RRQDSEDHSS DMFNYYEYCT ANAVTGPCRA SFPRWYFDVE 150
EST-konszenzus RNSCNNFIYG GCRGNKNSYR SEEACMLRCF RQENPPLPL GSKVYVLAGL 200
EST-konszenzus FVMVLLFLG ASMVYLIRVA RRNQRALRT VWSSGDDKEQ LVKNTYVL 248

4D. ábra

cDNS transzláció		ACC 3 T -47
cDNS transzláció	TGATCGCGAG ACCCCAACGG CTGGTGGCGT CGCCTGCGCG TCTCGGCTGA . S R D P N G W W R R L R V S A E	53 -30
cDNS transzláció	GCTGGCCATG GCGCAGCTGT GCGGGCTGAG GCGGAGCCGG GCGTTTCTCG L A M A Q L C G L R R S R A F L A	103 -13
cDNS transzláció	CCCTGCTGGG ATCGCTGCTC CTCTCTGGGG TCCTGGCGGC CGACCGAGAA L L G S L L L S G V L A A D R E	153 4
cDNS transzláció	CGCAGCATCC ACGACTTCTG CCTGGTGTGC AAGGTGGTGG GCAGATGCCG R S I H D F C L V S K V V G R C R	203 21
cDNS transzláció	GGCCTCCATG CCTAGGTGGT GGTACAATGT CACTGACGGA TCCTGCCAGC A S M P R W W Y N V T D G S C Q L	253 38
cDNS transzláció	TGTTTGTGTA TGGGGGCTGT GACGGAACA GCAATAATTA CCTGACCAAG F V Y G G C D G N S N N Y L T K	303 54
cDNS transzláció	GAGGAGTGCC TCAAGAAATG TGCCACTGTC ACAGAGAATG CCACGGGTGA E E C L K K C A T V T E N A T G D	353 71
cDNS transzláció	CCTGGCCACC AGCAGGAATG CAGCGGATTC CTCTGTCCCA AGTGCTCCCA L A T S R N A A D S S V P S A P R	403 88
cDNS transzláció	GAAGGCAGGA TTCTGAAGAC CACTCCAGCG ATATGTTCAA CTATGAAGAA R Q D S E D H S S D M F N Y E E	453 104
cDNS transzláció	TACTGCACCG CCAACGCAGT CACTGGGCCT TGCCGTGCAT CCTTCCCACG Y C T A N A V T G P C R A S F P R	503 121
cDNS transzláció	CTGGTACTTT GACGTGGAGA GGAACCTCTG CAATAACTTC ATCTATGGAG W Y F D V E R N S C N N F I Y G G	553 138
cDNS transzláció	GCTGCCGGGG CAATAAGAAC AGCTACCGCT CTGAGGAGGC CTGCATGCTC C R G N K N S Y R S E E A C M L	603 154
cDNS transzláció	CGCTGCTTCC GCCAGCAGGA GAATCCTCCC CTGCCCTTG GCTCAAAGGT R C F R Q Q E N P P L P L G S K Y	653 171
cDNS transzláció	GGTGGTCTG GCGGGGCTGT TCGTGATGGT GTTGATCCTC TTCCTGGGAG <u>V V L A G L F V M V L I L F L G A</u>	703 188
cDNS transzláció	CCTCCATGGT CTACCTGATC CGGGTGGCAC GGAGGAACCA GGAGCGTGCC <u>S M V Y L I</u> R V A R R N Q E R A	753 204
cDNS transzláció	CTGCGCACCG TCTGGAGCTT CGGAGATGA L R T V W S F G D	782 213

4E. ábra

cDNA	GCACGAGTTG	GGAGGTGTAG	CGCGGCTCTG	AACGCGCTGA	GGGCCGTTGA	50
cDNA	GTGTGCGCAGG	CGGCGAGGGC	GCGAGTGAGG	AGCAGACCCA	GGCATCGCGC	100
cDNA	GCCGAGAAGG	CCGGGCGTCC	CCCACTGAA	GGTCCGAAA	GGCGACTTCC	150
cDNA	GGGGGCTTTG	GCACCTGGCG	GACCCTCCCG	GAGCGTCGGC	ACCTGAACGC	200
cDNA	GAGGCGCTCC	ATTGCGCGTG	CGCGTTGAGG	GGCTTCCCGC	ACCTGATCGC	250
cDNA	GAGACCCAA	CGGCTGGTGG	CGTCGCCTGC	GCGTCTCGGC	TGAGCTGGCC	300
cDNS	ATGGCGCAGC	TGTGCGGGCT	GAGGCGGAGC	CGGGCGTTTC	TCGCCCTGCT	350
transzláció	M A Q L	C G L	R R S	R A F L	A L L	-11
cDNS	GGGATCGCTG	CTCCTCTCTG	GGGTCCTGGC	GGCCGACCGA	GAACGCAGCA	400
transzláció	G S L	L L S G	V L A	A D R	E R S I	7
cDNS	TCCACGACTT	CTGCCTGGTG	TCGAAGGTGG	TGGGCAGATG	CCGGGCCTCC	450
transzláció	H D F	C L V	S K V V	G R C	R A S	23
cDNS	ATGCCTAGGT	GGTGGTACAA	TGTCACTGAC	GGATCCTGCC	AGCTGTTTGT	500
transzláció	M P R W	W Y N	V T D	G S C Q	L F V	40
cDNS	GTATGGGGGC	TGTGACGGAA	ACAGCAATAA	TTACCTGACC	AAGGAGGAGT	550
transzláció	Y G G	C D G N	S N N	Y L T	K E E C	57
cDNS	GCCTCAAGAA	ATGTGCCACT	GTCACAGAGA	ATGCCACGGG	TGACCTGGCC	600
transzláció	L K K	C A T	V T E N	A T G	D L A	73
cDNS	ACCAGCAGGA	ATGCAGCGGA	TTCCTCTGTC	CCAAGTGCTC	CCAGAAGGCA	650
transzláció	T S R N	A A D	S S V	P S A P	R R Q	90
cDNS	GGATTCTGAA	GACCACTCCA	GCGATATGTT	CAACTATGAA	GAATACTGCA	700
transzláció	D S E	D H S S	D M F	N Y E	E Y C T	107
cDNS	CCGCCAACGC	AGTCACTGGG	CCTTGCCGTG	CATCCTTCCC	ACGCTGGTAC	750
transzláció	A N A	V T G	P C R A	S F P	R W Y	123
cDNS	TTGACGTGG	AGAGGAACTC	CTGCAATAAC	TTCATCTATG	GAGGCTGCCG	800
transzláció	F D V E	R N S	C N N	F I Y G	G C R	140
cDNS	GGGCAATAAG	AACAGCTACC	GCTCTGAGGA	GGCCTGCATG	CTCCGCTGCT	850
transzláció	G N K	N S Y R	S E E	A C M	L R C F	157
cDNS	TCCGCCAGCA	GGAGAATCCT	CCCCTGCCCC	TTGGCTCAA	GGTGGTGGTT	900
transzláció	R Q Q	E N P	P L P L	G S K	<u>V V V</u>	173
cDNS	CTGGCGGGGC	TGTTGCTGAT	GGTGTGATC	CTCTTCTGG	GAGCCTCCAT	950
transzláció	<u>L A G L</u>	<u>F V M</u>	<u>V L I</u>	<u>L F L G</u>	<u>A S M</u>	190
cDNS	GGTCTACCTG	ATCCGGGTGG	CACGGAGGAA	CCAGGAGCGT	GCCCTGCGCA	1000
transzláció	<u>V Y L I</u>	R V A	R R N	Q E R	A L R T	207
cDNS	CCGTCTGGAG	CTCCGGAGAT	GACAAGGAGC	AGCTGGTGAA	GAACACATAT	1050
transzláció	V W S	S G D	D K E Q	L V K	N T Y	223
cDNS	GTCCTGTGAC	CGCCCTGTGC	CCAAGAGGAC	TGGGGAAGGG	AGGGGAGACT	1100
transzláció	V L *					225

4F. ábra

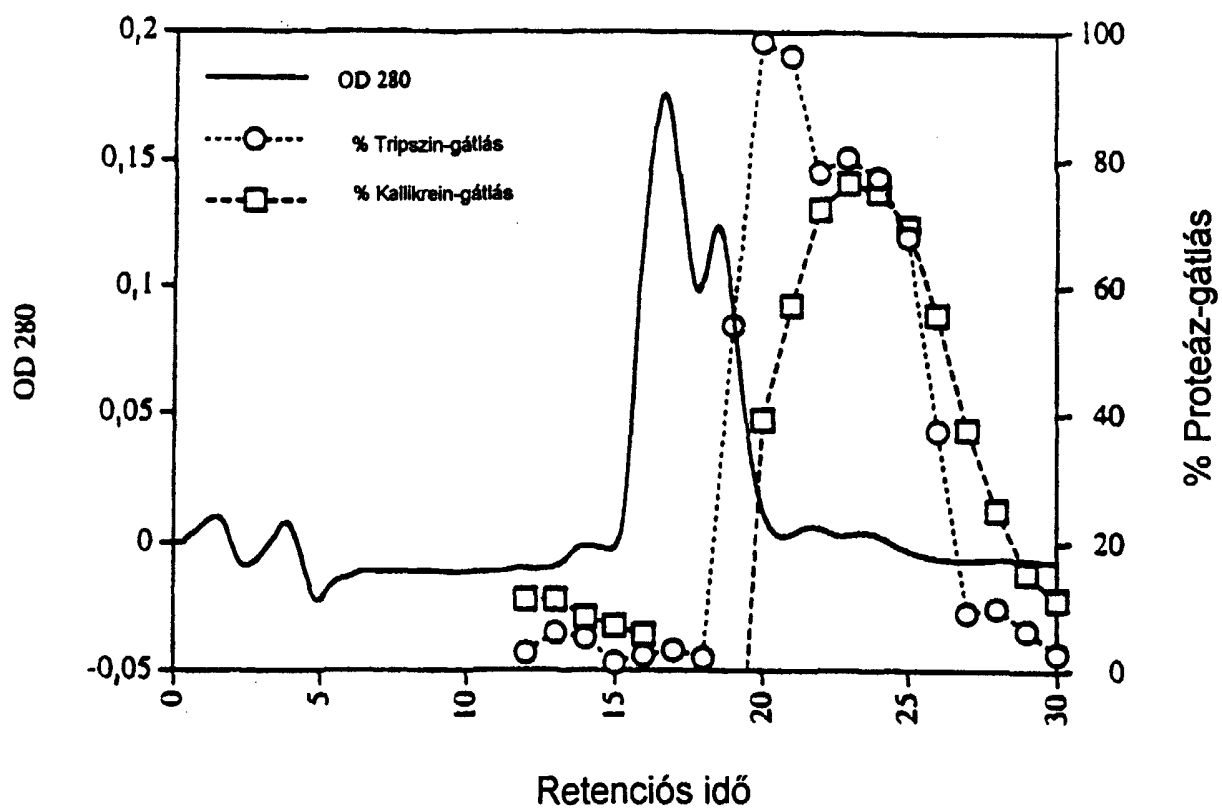
```
cDNA      ATGTGTGAGC TTTTTTAAA TAGAGGGATT GACTCGGATT TGAGTGATCA 1150
cDNA      TTAGGGCTGA GGTCTGTTT TCTGGGAGGT AGGACGGCTG CTCCTGGTC 1200
cDNA      TGGCAGGGAT GGGTTTGCTT TGGAAATCCT CTAGGAGGCT CCTCCTCGCA 1250
cDNA      TGGCCTGCAG TCTGGCAGCA GCCCCGAGTT GTTTCCTCGC TGATCGATT 1300
cDNA      CTTTCCTCCA GGTAGAGTTT TCTTTGCTTA TGTTGAATTC CATTGCCTCC 1350
cDNA      TTTTCTCNAT CACAGAAGTG ATGTTGGAAT CGTTTCTTTT GTTTGCTGA 1400
cDNA      TTTATGGTTT TTTAAGTAT AAACAAAAGT TTTTATTAG CATTCTGAAA 1450
cDNA      GAAGGAAAGT AAAATGTACA AGTTTAATAA AAAGGGGCCT TCCCCTTAG 1500
cDNA      AATAAATTC  CAGCATGTTG CTTTCAAAA  AAAAAAAAAA AAAA
1550
```

4F. ábra (folytatás)

EST-konszenzus				MLR	AEADGVSRL	GSLLSGVLA	-1
PCR-klón				MAQLCGL	RRSRAFLALL	GSLLSGVLA	-1
λcDNS-klón				MAQLCGL	RRSRAFLALL	GSLLSGVLA	-1
EST-konszenzus	ADRERSIHDF	CLVSKVVGRC	RASMPRWWYN	VTDGSCQLFV	YGGCDGNSNN		50
PCR-klón	ADRERSIHDF	CLVSKVVGRC	RASMPRWWYN	VTDGSCQLFV	YGGCDGNSNN		50
λcDNS-klón	ADRERSIHDF	CLVSKVVGRC	RASMPRWWYN	VTDGSCQLFV	YGGCDGNSNN		50
EST-konszenzus	YLTKEECLKK	CATVTENATG	DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF		100
PCR-klón	YLTKEECLKK	CATVTENATG	DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF		100
λcDNS-klón	YLTKEECLKK	CATVTENATG	DLATSRNAAD	SSVPSAPRRQ	DSEDHSSDMF		100
EST-konszenzus	NYEEYCTANA	VTGPCRASFP	RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE		150
PCR-klón	NYEEYCTANA	VTGPCRASFP	RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE		150
λcDNS-klón	NYEEYCTANA	VTGPCRASFP	RWYFDVERNS	CNNFIYGGCR	GNKNSYRSEE		150
EST-konszenzus	ACMLRCFRQQ	ENPPLPLGSK	<u>VVVLAGLEVM</u>	<u>VLJLELGASM</u>	<u>VYLIRVARRN</u>		200
PCR-klón	ACMLRCFRQQ	ENPPLPLGSK	<u>VVVLAGLEVM</u>	<u>VLJLELGASM</u>	<u>VYLIRVARRN</u>		200
λcDNS-klón	ACMLRCFRQQ	ENPPLPLGSK	<u>VVVLAGLEVM</u>	<u>VLJLELGASM</u>	<u>VYLIRVARRN</u>		200
EST-konszenzus	QERALRTVWS	SGDDKEQLVK	NTYVL				225
PCR-klón	QERALRTVWS	FGD					213
λcDNS-klón	QERALRTVWS	SGDDKEQLVK	NTYVL				225

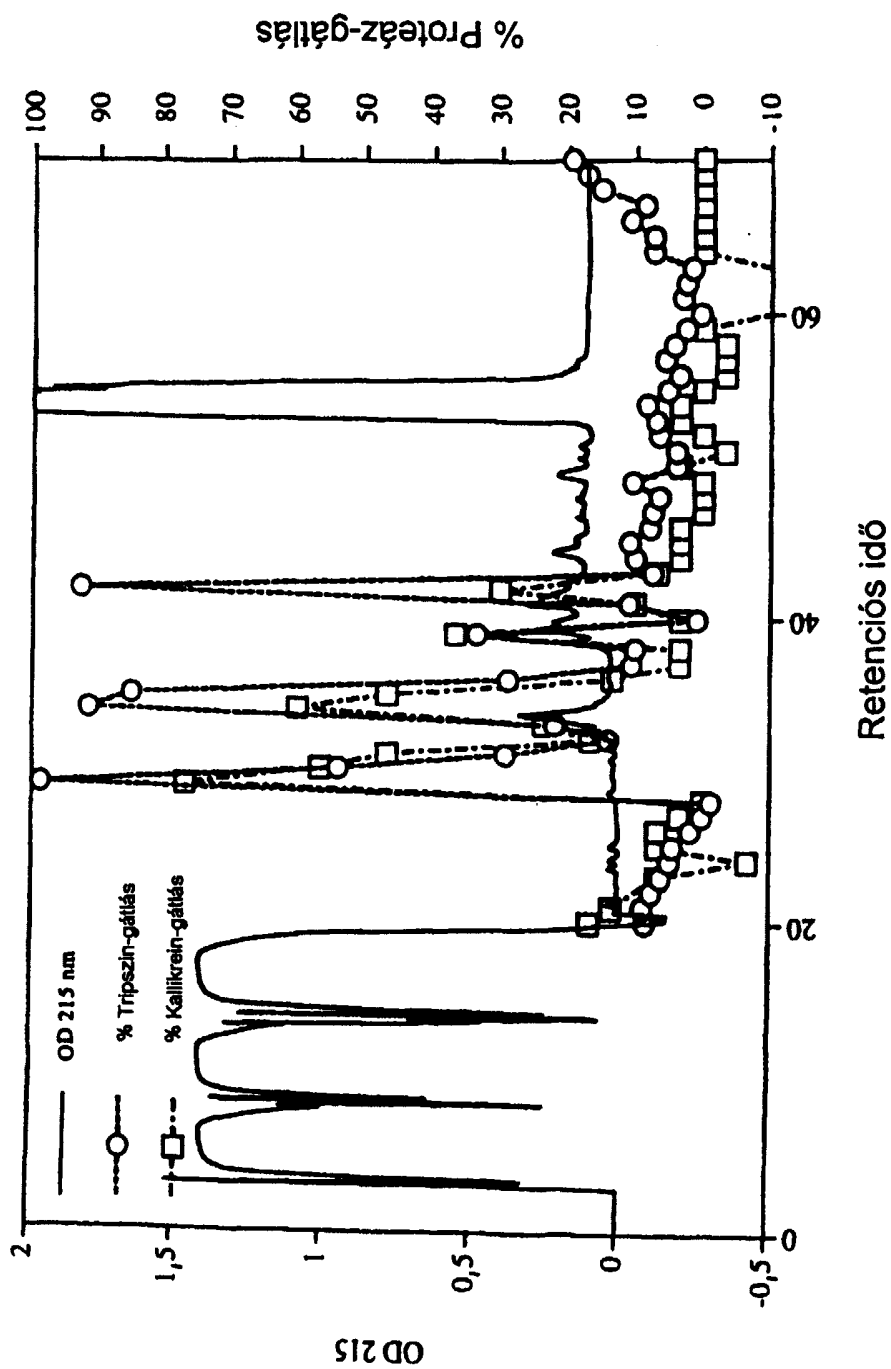
4G. ábra

Placenta-bikunin tisztítása, Superdex75-gélszűrőssel

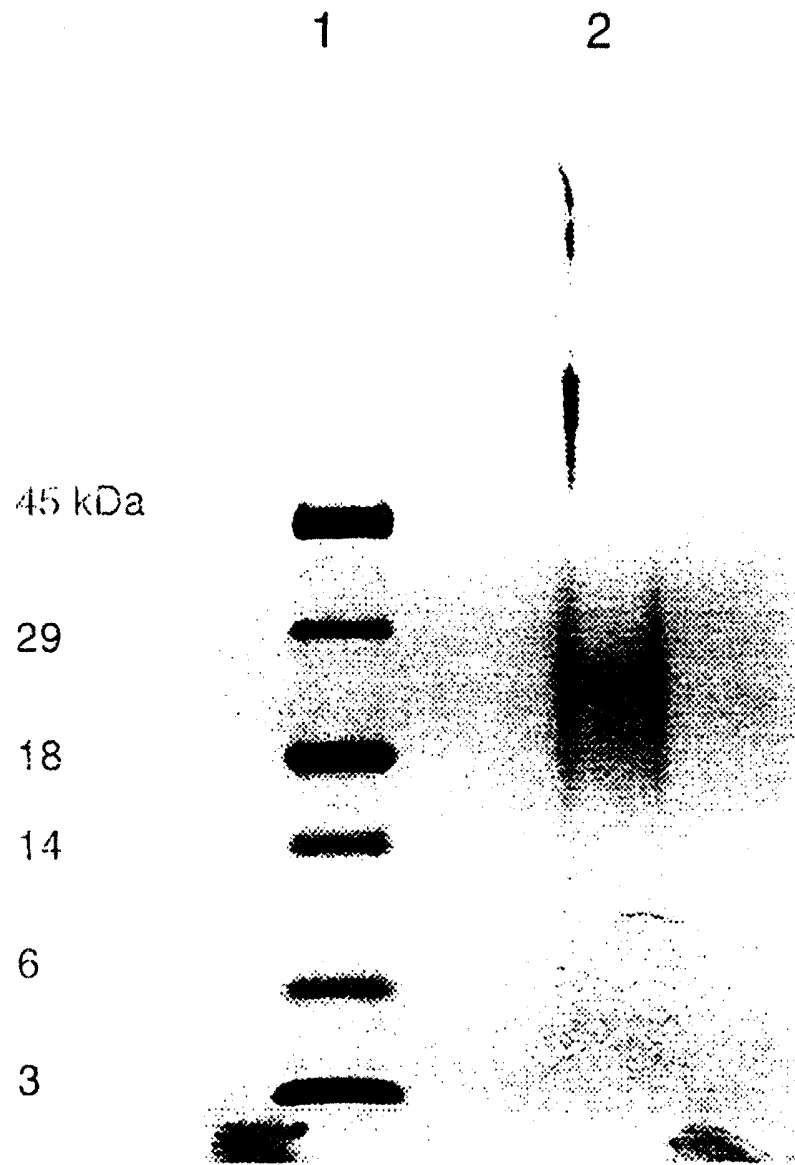


5. ábra

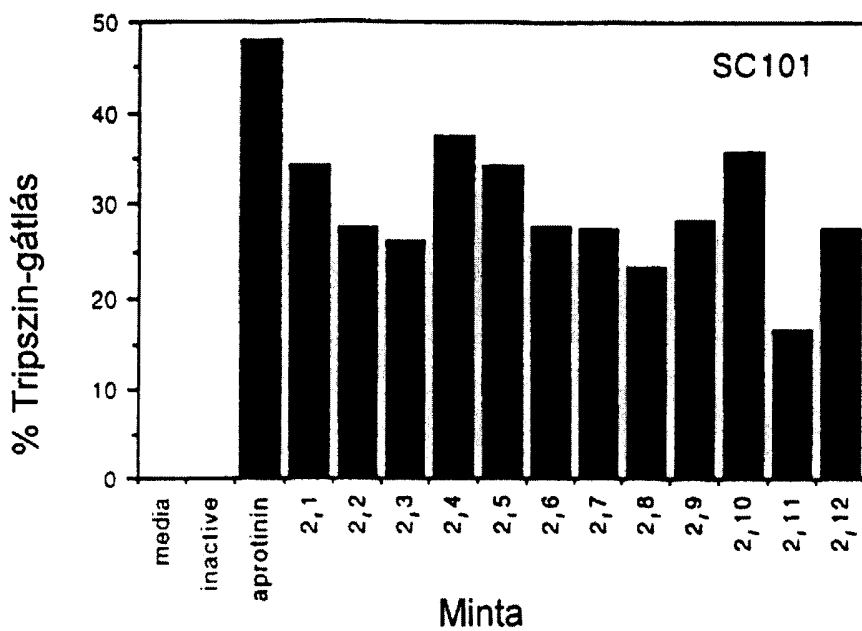
Placenta-bikunin tisztítása C18 reverz-fázisú kromatográfiával



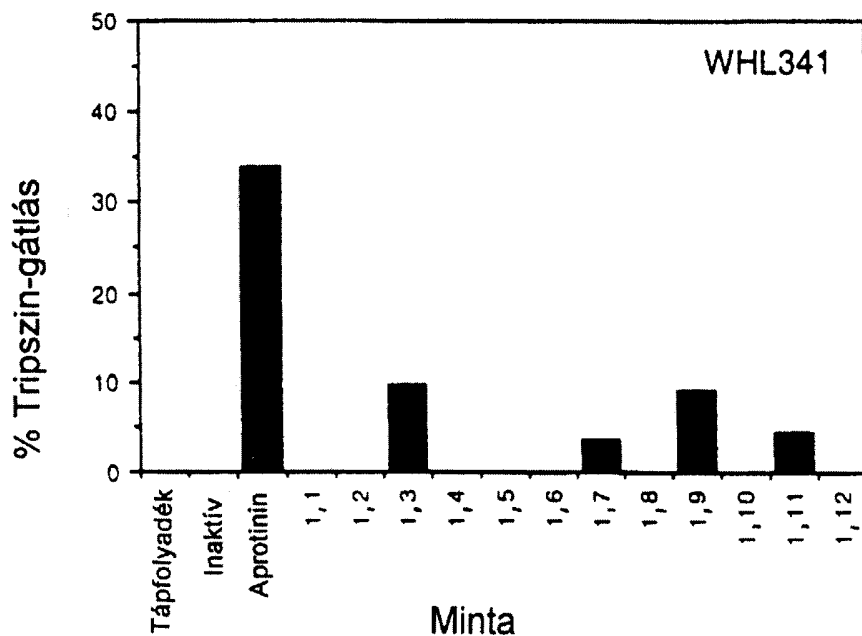
6. ábra



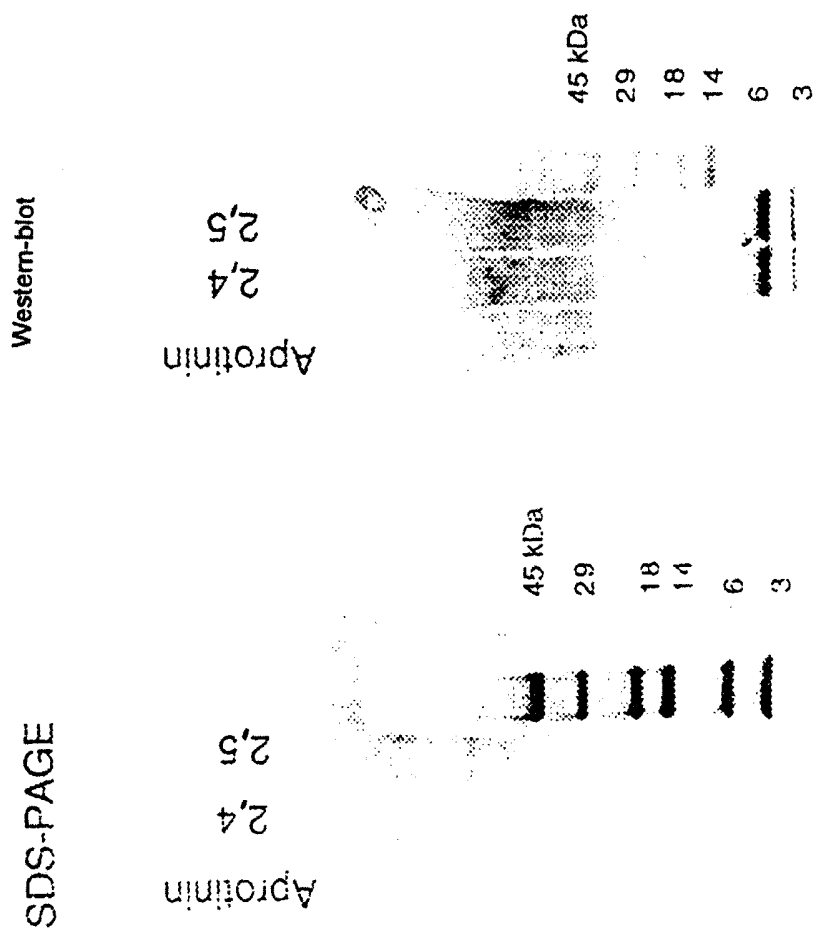
7. ábra



8A. ábra

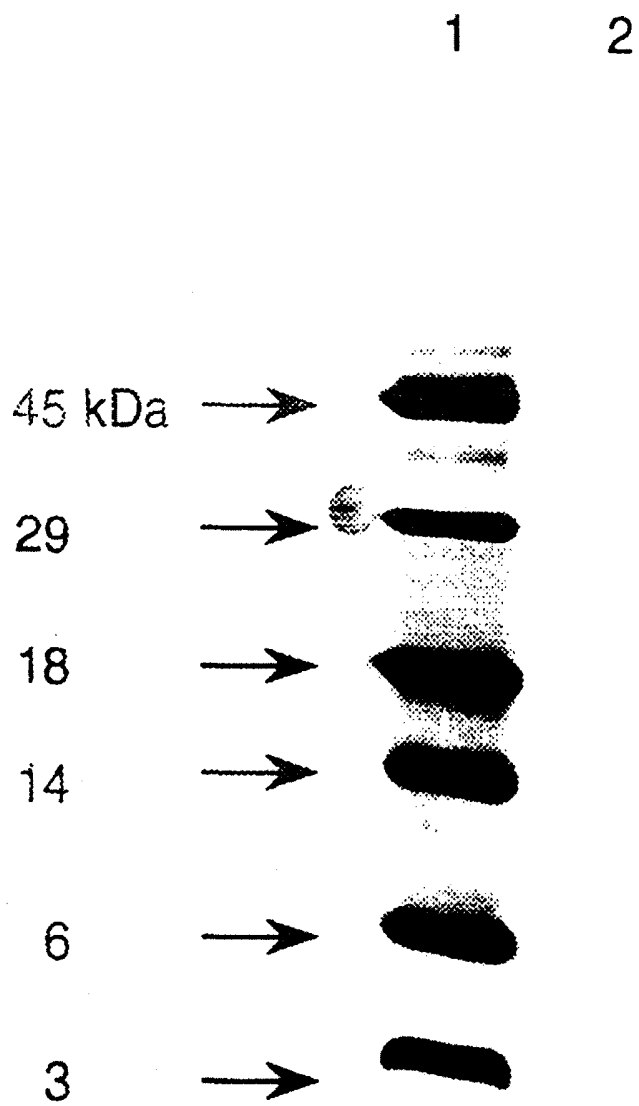


8B. ábra

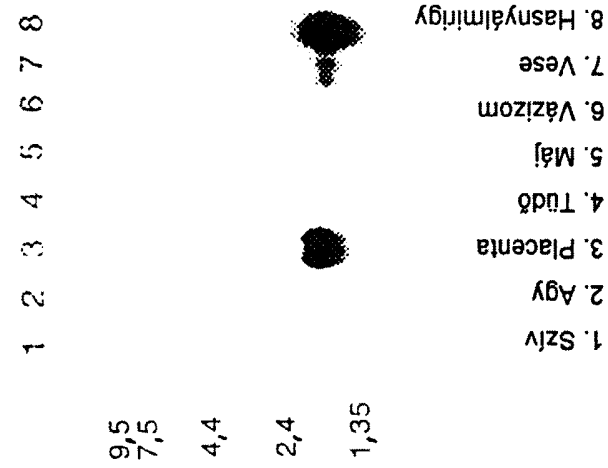
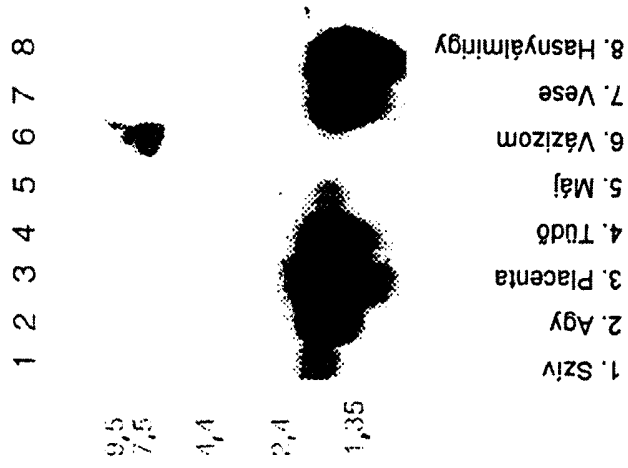


9B. ábra

9A. ábra



10. ábra



11A. ábra

11B. ábra

1 2 3 4 1 2 3 4

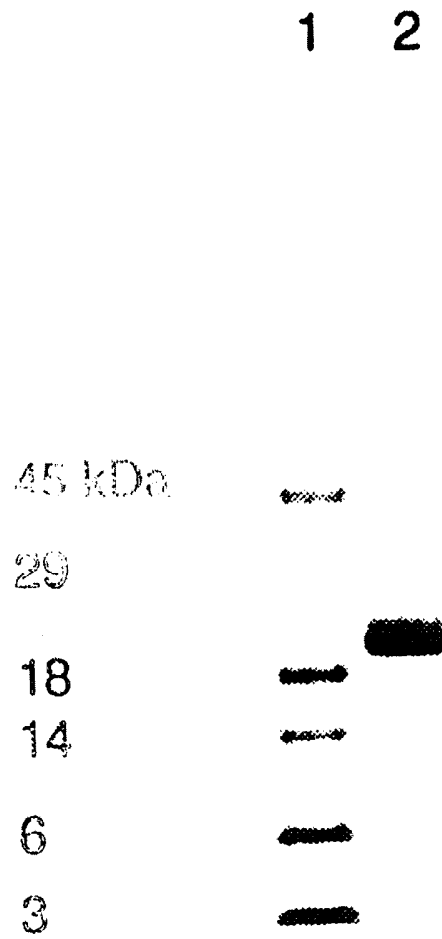
45 kDa
29
18
14
6
3

45 kDa
29
18
14
6
3

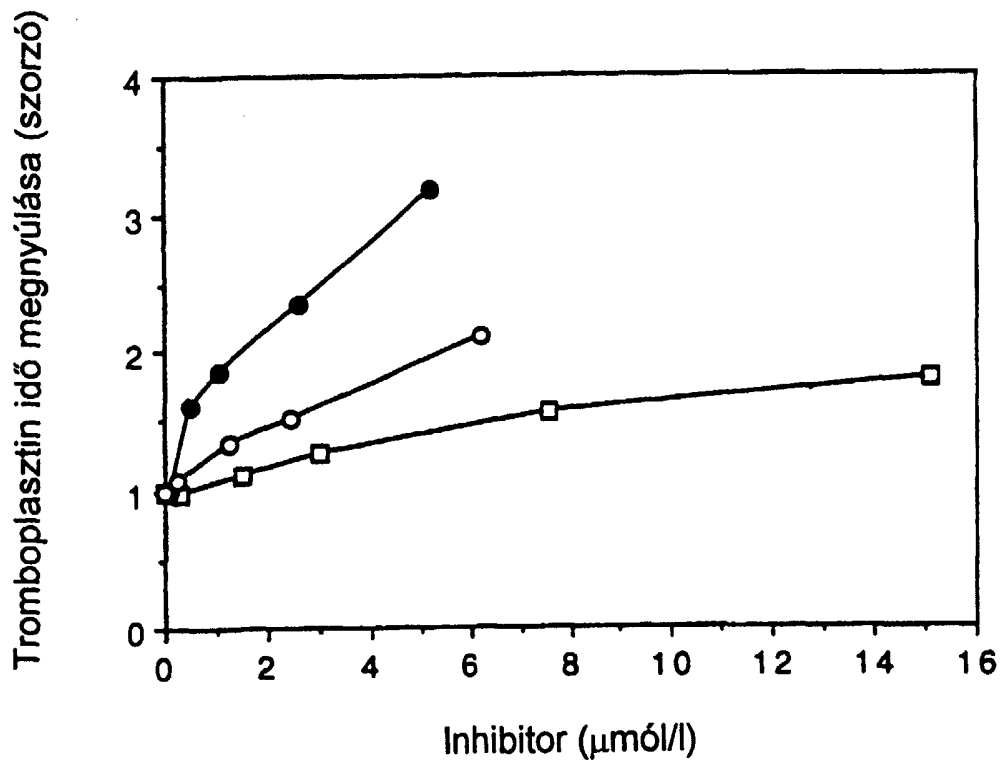


12A. ábra

12B. ábra



13. ábra



14. ábra