PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/08282
C12N 15/15, A61K 37/64 C12P 21/02	A1	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. April 1993 (29.04.93)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/02179

(22) Internationales Anmeldedatum: 21. September 1992 (21.09.92)

(30) Prioritätsdaten:
P 41 34 814.1 22. Oktober 1991 (22.10.91) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US):* BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US) :* FRIEDRICH, Thomas [DE/DE]; Saalbaustrasse 22-24, D-6100 Darmstadt (DE). BIALOJAN, Siegfried [DE/DE]; Gartenstrasse 34, D-6836 Oftersheim (DE). BOLLSCHWEILER, Claus [DE/DE]; Karl-Christ-Strasse 13, D-6900 Heidelberg (DE). KUENAST, Christoph [DE/DE]; Salierstrasse 2, D-6701 Otterstadt (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: NEW THROMBIN-INHIBITING PROTEIN ISOLATED FROM TICKS

(54) Bezeichnung: NEUES THROMBININHIBITORISCHES PROTEIN AUS ZECKEN

(57) Abstract

Described is a new thrombin-inhibiting protein isolated from ticks, with a molecular weight of about 8000 Daltons and the N-terminus Leu-Asn-Val-Leu-Cys-Asn-Asn-Pro-His-Thr-Ala-Asp-Cys-Asn-Asn-Asp-Ala-Gln-Val-Asp. The protein is suitable for use in the treatment of illnesses.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein neues thrombininhibitorisches Protein aus Zecken mit einem Molekulargewicht von etwa 8000 Dalton und dem N-Terminus Leu-Asn-Val-Leu-Cys-Asn-Asn-Pro-His-Thr-Ala-Asp-Cys-Asn-Asn-Asp-Ala-Gln-Val-Asp beschrieben. Das Protein eignet sich zur Bekämpfung von Krankheiten.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NL	Niederlande
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	PT	Portugal
BR	Brasilien	IE	Irland	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SK	Slowakischen Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechischen Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Neues thrombininhibitorisches Protein aus Zecken

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues thrombininhibitorisches Protein aus Zecken sowie Verfahren zu dessen Herstellung.

Thrombin-Inhibitoren sind wichtige therapeutische Substanzen, die beispielsweise zur Prophylaxe oder Behandlung von Thrombosen oder arteriellen Reokklusionen verwendet werden.

In der deutschen Offenlegungsschrift DE 39 31 839 wird ein Thrombinininhibitor, der aus der Lederzecke Ornithodoros moubata isoliert worden ist, beschrieben. Dieses Protein besitzt ein Molekulargewicht von etwa 15000 Dalton, einen isoelektrischen Punkt von pH 4-5 und die N-terminale Aminosäuresequenz SDYEFPPPKKXRPG.

In der europäischen Offenlegungsschrift EP 345 614 wird der thrombininhibitorische Wirkstoff Amblyommin beschrieben, der aus Schildzecken isoliert wird. Es handelt sich dabei um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 20 000 - 30 000 Dalton und einem isoelektrischen Punkt zwischen 5,05 und 5,65.

Bisher wurde jedoch noch kein Protein mit thrombininhibitorischer Wirkung gefunden, das als Arzneimittel hinsichtlich hoher Wirksamkeit, fehlender Antigenizität, langer biologischer Halbwertzeit, geringer Nebenwirkung wie z.B. Blutungsneigung, vorteilhaft geeignet ist.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, neue Thrombin-Inhibitoren zur Verfügung zu stellen, die als Arzneimittel hinsichtlich der oben genannten Eigenschaften geeignet sind.

Demgemäß wurde ein neues thrombininhibitorisches Protein aus Zecken isoliert.

Das neue Protein besitzt folgende physikochemischen Eigenschaften. Durch Molekularsiebchromatographie wird ihm ein Molekulargewicht von 22000 - 28000 Dalton zugeordnet. In einem SDS-Polyacrylamidgel wird ein Molekulargewicht von 8000

± 1500 Dalton bestimmt. Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes ergibt einen pH-Wert von kleiner als 3,8.

Das Protein bindet spezifisch an eine Thrombin-Affinitätssäule. Es hemmt die biologische Aktivität von Thrombin in einem in-vitro Enzymtest.

In einem Polyacrylamidgel läßt sich die Proteinbande durch Silberfärbung nicht anfärben; sie ist nur als nicht-gefärbter Fleck auf einem gefärbten Hintergrund sichtbar.

Folgende N-terminale Aminosäuresequenz wurde von dem Protein bestimmt (SEQ ID NO:1):

Leu-Asn-Val-Leu-Cys-Asn-Asn-Pro-His-Thr-Ala-Asp-Cys-Asn-Asn-Asp-Ala-Gln-Val-Asp-Arg-Tyr-Phe-Arg-Glu-Gly-Thr-Thr-Cys-Leu-Met-Ser-Pro.

Die gesamte Aminosäuresequenz des neuen Proteins ist in SEQ ID NO: 7 dargestellt.

Weitere erfindungsgemäße Proteine sind solche, die sich von der in SEQ ID NO: 7 dargestellten Aminosäuresequenz durch Austausch von bis zu 10 Aminosäuren oder durch Deletion einzelner Aminosäuren unterscheiden.

Solche Aminosäuresequenzen lassen sich beispielsweise über ein entsprechend mutiertes Gen leicht gentechnisch herstellen.

Das neue Protein läßt sich aus Zecken der Gattung Ornithodoros isolieren. Hierzu werden die Zecken zweckmäßigerweise in einem Puffer bei pH 6 bis 9, vorzugsweise pH 7 bis 8 aufgenommen und mit einem Homogenisator, vorzugsweise einem Mixer, homogenisiert. Anschließend werden die unlöslichen Bestandteile abgetrennt, bevorzugt abzentrifugiert.

Aus der so erhaltenen Lösung kann das Protein weiter gereinigt werden, indem mit einem Fällungsmittel, bevorzugt Trichloressigsäure, andere Proteine aus der Lösung ausgefällt und anschließend abgetrennt werden.

Die weitere Reinigung des Proteins kann über chromatographische Methoden, bevorzugt Ionenaustauschchromatographie und/oder Affinitätschromatographie erfolgen. Besonders bevorzugt ist ein Reinigungsschritt über Thrombin-Affinitätschromatographie.

Die Reinigung des Proteins kann über einen Thrombin-Aktivitätstest verfolgt werden. Hierzu benutzt man zweckmäßigerweise einen optischen Test, bei dem ein chromogenes Substrat, beispielsweise Chromozym T, durch Thrombin umgesetzt wird. Die das neue Protein enthaltenden Fraktionen können bei Zugabe in diesen optischen Test an ihrer Thrombin inhibierenden Wirkung erkannt werden.

Besonders geeignet zur Herstellung des erfindungsgemäßen Proteins sind gentechnische Verfahren.

Hierzu wird in an sich bekannter Weise eine cDNA-Genbank aus der Zecke angelegt. Aus dieser Genbank kann das für das erfindungsgemäße Protein kodierende Gen isoliert werden, indem man beispielsweise eine DNA-Probe herstellt, deren Sequenz von der oben beschriebenen N-terminalen Aminosäuresequenz durch Rückübersetzung gemäß dem genetischen Code erhalten wird. Durch Hybridisierung mit dieser DNA-Probe läßt sich das entsprechende Gen auffinden und isolieren.

Für die Herstellung des entsprechenden Gens kann aber auch die Polymerase-Chain-Reaction (PCR)-Technik eingesetzt werden. Beispielsweise läßt sich mit Hilfe eines Primers, dessen Sequenz durch Rückübersetzung aus der oben beschriebenen N-terminalen Aminosäuresequenz erhalten wurde, und eines zweiten Primers, dessen Sequenz komplementär zum 3'-Ende des cDNA-Genfragments ist, bevorzugt mit der Sequenz Poly(dT), das cDNA-Genfragment für das erfindungsgemäße Protein durch PCR-Technik herstellen. Das entsprechende Gen läßt sich auch isolieren, indem man eine Expressionsgenbank von Zecken anlegt und diese mit einem Antikörper der gegen das erfindungsgemäße Protein gerichtet ist, absucht.

Das Gen für das eingangs beschriebene Protein hat die in SEQ ID NO: 6 dargestellte Nukleotidsequenz.

Außer diesem Gen sind auch solche Nukleotidsequenzen geeignet, die für die in SEQ ID NO: 7 dargestellte Aminosäuresequenz codieren, infolge der Degeneration des gentechnischen Codes jedoch eine andere Nukleotidsequenz als SEQ ID NO: 6 aufweisen. Solche Gene lassen sich durch cehmische Totalsynthese oder durch Mutagenese der SEQ ID NO: 6-Nukleotidsequenz herstellen.

Nachdem das entsprechende Gen isoliert worden ist, kann es durch gentechnische Verfahren in Organismen, z.B. in Bakterien, Hefen, eukaryontischen Zellen, mit Hilfe eines Expressionsvektors in an sich bekannter Weise exprimiert werden. Bevorzugt wird in Prokaryonten, wie z.B. E.coli und mit Hilfe stark exprimierender Vektoren, z.B. unter der Kontrolle des induzierbaren tac-Promotors wie z.B. in Plasmid pMAL-p2 (Protein Fusion und Purification System, GeneExpreß; New England Biolabs) vorhanden, gearbeitet. Dabei kommt es zur periplasmatischen Expression eines Fusionsproteins aus dem Maltose-Bindungsprotein und dem beschriebenen Thrombininhibitor. Der Fusionspartner kann nach Reinigung enzymatisch entfernt werden. Aus diesen rekombinanten Wirtssystemen läßt sich das Protein aufgrund der oben beschriebenen physikochemischen Eigenschaften isolieren.

Die generelle Vorgehensweise zur gentechnischen Herstellung eines neuen Proteins bei bekannter Aminosäurepartialsequenz ist in Lehrbüchern der Gentechnologie, beispielsweise E.L. Winnacker, Gene und Klone, Verlag Chemie, Weinheim, 1984, beschrieben. Die experimentellen Bedingungen für die einzelnen Verfahren wie beispielsweise Anlegen einer Genbank, Hybridisierung, Expression eines Gens sind bei J. Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben.

Das erfindungsgemäße Protein wird bevorzugt in Form seiner pharmazeutisch annehmbaren Salze verwendet.

Das neue Protein besitzt blutgerinnungshemmende Eigenschaften. Es kann beispielsweise zur Prophylaxe von Thrombosen oder arteriellen Reokklusionen, zur Behandlung von Thrombosen, zur Konservierung von Blut oder bei der extrakorporalen Zirkulation verwendet werden.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter veranschaulicht.

Beispiel 1

Reinigung des thrombininhibitorischen Proteins aus Zecken

Eine Laborkultur der Zecken (Onithodoros moubata) wurde bei 28°C und 80 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. In 14-tägigen Abständen wurden die Zecken dadurch gefüttert, daß sie an Kaninchen saugen konnten. Zecken aller Entwicklungsstadien wurden bei -20°C eingefroren.

60 g Zecken wurden mit 400 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer, 150 mM NaCl (pH 7,5) homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 Minuten bei 7000 U/min (Sorvall RC-5B, Rotor GS-3) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen und der Überstand mit 25 ml 50 Gew.% Trichloressigsäure durch Zutropfen über einen Zeitraum von 15 Minuten versetzt.

Danach wurde zentrifugiert (20 Minuten, 7000 U/min) und der Überstand mit Natronlauge neutralisiert.

Der neutralisierte Überstand wurde in Dialyseschläuche (Ausschlußvolumen 300 Da) gefüllt und mehrfach gegen das 10-fache Volumen 20 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 8,0 dialysiert.

Die dialysierte Proteinlösung wurde auf eine Q-Sepharose Säule® (Pharmacia) aufgetragen (60 ml/h), die in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 äquilibriert worden war (Durchmesser 1,5 cm, Höhe 6 cm, Volumen 11 ml).

Es wurde mit 10 Säulenvolumen Äquilibrierungspuffer gewaschen.

Danach wurde ein linearer Gradient von 50 ml 20 mM Natriumphosphat (pH 8,0), nach 50 ml 20 mM Natriumphosphat (pH 8,0), 1 M NaCl angelegt.

Aktive Fraktionen (gemessen durch Thrombininhibition) wurden gesammelt.

Die vereinigten aktiven Fraktionen aus der Q-Sepharose®-Chromatographie wurden auf eine Kupferchelat-Chromatographiesäule (Durchmesser 2,5 cm, Höhe 6 cm, Volumen 30 ml) gegeben, die mit 20 mM Natriumphosphat (pH 8,0), 150 mM NaCl äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumen Äquilibrierungspuffer gewaschen (1,5 ml/min) und mit einem Gradienten von 150 ml 20 mM Natriumphosphat (pH 8,0), 150 mM NaCl nach 150 ml 20 mM Natriumphosphat (pH 8,0), 150 mM NaCl, 100 mM Imidazol eluiert.

Aktive Fraktionen (gemessen durch Thrombininhibition) wurden gesammelt.

Die vereinigten aktiven Fraktionen wurden auf eine Affinitätssäule mit immobilisiertem Thrombin aufgetragen (Durchmesser 1,5 cm, Höhe 6,5 cm, 11,5 ml Säulenvolumen, 60 ml/h). Die Säule wurde gemäß Beispiel 3 hergestellt.

Die Säule wurde mit 20 mM Natriumphosphat pH 7,5 äquilibriert. Nach Auftragen der Proteinlösung wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen Äquilibrierungspuffer gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm auf Null zurückging.

Danach wurde mit 0,5 M NaCl, 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 gewaschen. Unspezifisch adsorbiertes Material wurde so entfernt.

Spezifisch an Thrombin gebundenes Protein wurde mit 0,1 M Glycin, 0,5 M NaCl pH 2,8 eluiert. Die Säule wurde anschließend sofort wieder mittels Phosphatpuffer auf pH 7,5 eingestellt.

Die einzelnen Fraktionen wurden mit 0,1 M NaOH neutralisiert und auf ihre inhibitorische Wirkung gegen Thrombin untersucht.

Die durch Glycin/NaCl-Puffer pH 2,8 eluierten Fraktionen besaßen thrombininhibierende Wirkung.

Die gesammelten aktiven Fraktionen wurden, nachdem sie neutralisiert worden waren, mit Wasser verdünnt (1:10) und auf eine Mono-Q-Säule® gegeben (Pharmacia, 1 ml Säulenvolumen).

Die Säule wurde äquilibriert mit 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5, 150 mM NaCl (Puffer A). Es wurde mit Puffer A gewaschen bis die Absorption auf Null zurückging (10 Minuten). Dann wurde innerhalb von 50 Minuten auf 20 mM Natriumphosphat, pH 7,5, 800 mM NaCl (Puffer B) gewechselt (Fluß 0,5 ml/min).

Thrombin hemmende Fraktionen wurden gesammelt.

Die gesammelten Fraktionen wurden an einer RP 318® (Biorad) HPLC-Chromatographiesäule weiter gereinigt. Die Säule wurde äquilibriert mit 0,1 Gew.% Trifluoressigsäure (TFA) in dest. Wasser. Die vereinigten aktiven Fraktionen wurden auf die Säule aufgetragen. Mit einem Gradienten nach 0,1 % TFA, 100 % Acetonitril während einer Stunde und einer Flußrate von 1 ml/min wurde die Säule eluiert. Die Absorption wurde bei 280 nm bestimmt. Es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die gesammelten Fraktionen wurden zur Trockene einkonzentriert und in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) (0,8 g/l NaCl; 0,2 g/l HCl; 0,144 g/l Natriumphosphat; 0,2 g/l Kaliumphosphat, pH 7,5) aufgenommen sowie die inhibitorische Aktivität bestimmt.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Vorschrift von Bradford (Anal. Biochem., 72, 248-254 (1976)). Als Standardprotein diente Rinderserumalbumin (Boehringer Mannheim).

Beispiel 2

Bestimmung der Hemmung von Thrombin durch den Inhibitor

Thrombin (Boehringer Mannheim) wurde zu einer Endkonzentration von 25 mU/ml in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) (0,8 g/l NaCl; 0,2 g/l HCl; 0,144 g/l Natriumphosphat; 0,2 g/l Kaliumphosphat, pH 7,5) gelöst.

Chromozym TH (Boehringer Mannheim) wurde in 20 ml H_2O/Flasche gelöst.

50 µl Thrombinlösung und 100 µl Chromozym sowie 25 µl Probe oder Puffer wurden in die Näpfe einer Mikrotiterplatte gegeben. Sofort danach wurde zur Zeit 0 und nach 30 Minuten bei 37°C die Absorption bei 405 nm gemessen.

Bei starker Eigenfarbe der Probe wurde eine weitere Kontrolle ohne Thrombin wie oben behandelt.

Durch die Aktivität des Thrombins wird aus dem chromogenen Farbsubstrat ein bei 405 nm absorbierender Farbstoff freigesetzt. Die Hemmung des Thrombins durch einen Thrombininhibitor ist an einer geringeren Absorptionszunahme bei 405 nm erkennbar und wurde mit Hilfe einer Eichkurve quantifiziert.

Beispiel 3

Herstellung einer Affinitätssäule mit Thrombin als Ligand

a) Kopplung:

2 g CNBr aktivierte Sepharose (Pharmacia) wurden mit 200 ml 1 mM HCl auf einer Nutsche gewaschen. Das Gel wurde in 100 mM $NaHCO_3$, 500 mM NaCl pH 8,3 aufgenommen und sofort mit 10000 Units Thrombin (Sigma) in 100 mM $NaHCO_3$, 500 mM NaCl, pH 8,3 gemischt.

Die Lösung wurde 24 Stunden bei 4°C vorsichtig geschüttelt.

b) Blockierung:

Das Gelmaterial wurde nach Absetzen mit 100 mM $NaHCO_3$, 500 mM NaCl, pH 8,3 gewaschen. Die Sepharose wurde dann mit 100 mM $NaHCO_3$, 500 mM NaCl, 1 M Ethanolamin pH 8,3 für 2 Stunden inkubiert.

c) Vorbereitung:

Zur Entfernung des ungebundenen Thrombin wird das Gelmaterial vor Gebrauch noch einmal in der Säule mit 20 Säulenvolumen PBS pH 7,4 gewaschen.

Beispiel 4

Bestimmung des Molekulargewichts durch Molekularsiebchromatographie.

Bei einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min wurde durch Mono-Q®-Chromatographie gereinigtes Material in 20 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,5 auf einer Molekularsiebsäule des Typs TSK® (Pharmacia, Spherogel TSK 3000® SW, 7,5 mm Durchmesser, 60 cm Höhe) getrennt.

Ebenso wurde mit den Eichproteinen verfahren (Serumalbumin MW 67000 Da, Ovalbumin MW 45000 Da, Chymotrypsinogen A MW 25000 Da).

Der Logarithmus des Molekulargewichts der Eichproteine wurde gegen deren Elutionszeit in einem Diagramm aufgetragen.

In den fraktionierten Eluaten der Probe wurde die Thrombininhibition bestimmt.

Die Elutionszeit des Inhibitors ergab am Schnittpunkt mit der Eichgeraden den Logarithmus des gesuchten Molekulargewichts.

Durch diese Bestimmung wurde ein Molekulargewicht zwischen 22 000 und 28 000 Dalton bestimmt.

Beispiel 5

Bestimmung des Molekulargewichts durch Tricine-SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese.

(Literatur: Analytical Biochemistry, 166, 368 - 379 (1987) Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the range from 1 - 1000 kDa, Schägger, H. and von Jagow, G.)

Die Gelelektrophorese wurde entsprechend der Literaturvorschrift bei 20 mA und 1400 V, 30 Watt, durchgeführt.

Das nach dieser Methode bestimmte Molekulargewicht betrug 8000 ± 1500 Dalton.

Als Eichproteine dienten (Intaktes Myoglobin 17,2 kDa, Bromcyanpeptid Myoglobin I+II 14,6 kDa, Bromcyanpeptid Myoglobin I 8,2 kDa, Bromcyanpeptid Myoglobin II 6,4 kDa, Bromcyanpeptid Myoglobin III 2,6 kDa, Myoglobin 1-14)

Beispiel 6

Sequenzbestimmung des Inhibitors
Reduktion und Carboxymethylierung.

2,8 ml Proteinlösung (0,029 mg/ml) wurden mit 0,28 ml Puffer (1 M Tris/HCl, 0,5 M Guanidinhydrochlorid, pH 8,6), gemischt. Danach wurden 0,116 ml Dithiothreitol (DTT, 10 mg/ml) zugegeben und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde nach Zugabe von 0,185 ml Jodacetamid (10 mg/ml) für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,073 ml DTT wie oben beendet.

Das Protein wurde durch erneute reversed phase HPLC an RP 318® gereinigt. Das Gemisch wurde auf eine Endkonzentration von 0,1 Gew.% Trifluoressigsäure (TFA) eingestellt und in einem HPLC System von Hewlett Packard (HP 1090 Liquid Chromatograph) getrennt. Mit Lösungsmittel A (0,1 % TFA, 100 % H_2O) wurde 5 Minuten gewaschen. Dann wurde der Anteil von Lösungsmittel B (90 % Acetonitril, 10 % H_2O, 0,1 Gew.% TFA) im Verlauf von 120 Minuten auf 50 % angehoben. Die Absorption des Eluats bei 214 und 280 nm wurde gemessen. Absorbierende Fraktionen wurden gesammelt. Das Protein wurde durch SDS-Gelelektrophorese identifiziert und einer Sequenzanalyse auf einem Applied Biosystems 477 A Protein Sequencer nach Vorschrift des Geräteherstellers unterworfen.

Folgende Sequenz wurde erhalten (SEQ ID NO:1):
Leu-Asn-Val-Leu-Cys-Asn-Asn-Pro-His-Thr-Ala-Asp-Cys-Asn-Asn-Asp-Ala-Gln-Val-Asp-Arg-Tyr-Phe-Arg-Glu-Gly-Thr-Cys-Leu-Met-Ser-Pro.

Beispiel 7

Bestimmung des isoelektrischen Punktes durch isoelektrische Fokussierung

Die Bestimmung wurde mit einem LKB Multiphor 2117 (Horizontalsystem) und einem LKB powersupply 2103 durchgeführt. Es wurden Fertiggele eingesetzt (Pharmacia Ampholine PAGplate pH 3,5 - 9,5). Als Standarproteine wurden Amyloglucosidase pH 3,5; Soyabean Trypsin Inhibitor, pH 4,55; β-Lactoglobulin A, pH 5,2; Bovine carbonic anhydratase, pH 5,85; Human carbonic anhydratase, pH 6,55; Horse myoglobin, pH 6,85 und 7,35; Lentil Lectin, pH 8,15, 8,45, 8,65 und Trypsinogen, pH 9,3 eingesetzt.

Die Bedingungen der Fokussierung: 1500 Volt, 30 Watt.
Puffer: Anode 1M Phosphorsäure
Kathode 1M Natronlauge

Die Platten wurden 30 Minuten zur Ausbildung eines pH-Gradienten vorfokussiert. Die Proben wurden auf Filterplättchen aufgetragen, die auf dem Gel lagen. Für 30 Minuten wurde weiterfokussiert, die Filterplättchen abgenommen, und nach weiteren 30 Minuten wurde die Fokussierung beendet. Die Gele wurden sofort in 2 mm Scheiben geschnitten und in dest. Wasser überführt. Über Nacht eluierte das Protein aus den Gelscheiben. Durch einen Thrombininhibitionstest wurde die Lage des Thrombininhibitors bestimmt. Der pH-Wert kann auch direkt durch eine pH-Elektrode bestimmt werden. Hirudin, als Vergleichssubstanz hatte einen isoelektrischen Punkt von pH 3,5 und niedriger. Der neue Inhibitor hatte einen isoelektrischen Punkt von pH kleiner als 3,8.

Beispiel 8

Herstellung einer DA-Sequenz, die für ein thrombininhibitorisches Protein codiert.

a) Isolierung von RNA und Herstellung einer cDNA-Bank

Gesamt-RNA aus ganzen Tieren der Spezies Ornithodoros moubata wurde durch Aufschluß in Guanidiniumthiocyanat gewonnen. Dabei wurde mit Materialien und nach Anleigung des "RNA

Isolation Kit" der Firma Stratagene, La Jolla, CA, USA (Katalog Nr: 200345) gearbeitet.

Die polyadenylierte messenger RNA wurde aus der Gesamt-RNA durch oligo (dT)-Affinitätsseparation selektiert. Dieses Verfahren wurde mit Materialien und nach Anleitung des "PolyATtract mRNA Isolation System" der Firma Promega, Madison, WI, USA (Katalog Nr: Z5200) durchgeführt.

Aus polyadenylierter messenger RNA wurde mit Materialien und nach Anleigung des "ZAP-cDNA Synthesis Kit" der Firma Stratagene, La Jolla, CA, USA (Katalog Nr: 200400) cDNA synthetisiert, die dann in die Eco RV Restriktionsstelle des Plasmids p Bluesecript II SK der Firma Stratagene, La Jolla, USA (Katalog Nr: 212205) kloniert wurde.

b) Herstellung von Oligonukleotidproben für die PCR

Zur Klonierung von cDNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, s. "Molecular Cloning" 2nd edition (1989), Sambrook, J. et al., CSH-Presse, Seite 14.1 ff.) wurde von Peptiden der in Beispiel 6 beschriebenen Protein-Sequenz ausgegangen.

Unter Zugrundelegung des genetischen Codes läßt sich aus der Peptidsequenz I):
NH_2-Cys-Asn-Asn-Pro-His-Thr-Ala (Pos 5-11)

die Nukleinsäuresequenz (Seq ID NO:2):
5'-TGY AAY AAY CCN CAY ACN GC-3'

und aus der Peptidsequenz II):

NH_2-Pro-His-Thr-Ala-Asp-Cys-Asn (Pos 8-14)

die Nukleinsäuresequenz (Seg ID NO: 3)
5'-CCN CAY ACN GCN GAY TGY AA TG-3'

des kodierenden DNA-Stranges herleiten. Wegen der bekannten Degeneration des genetischen Codes sind an manchen Positionen mehrere Nukleotide (N: A, C, G, T; Y: C, T;) einsetzbar. Damit ergibt sich für SEQ ID NO: 2 eines 256fache und für

SEQ ID NO: 3, eine 512fache Gemischkomplexität. Die genannten Sequenzen wurden als Oligonukleotide synthetisiert.

Die Synthesen wurden mit einem Applied Biosystems Typ 360A DNA-Synthesizer durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden nach Entfernung der Schutzgruppen gelelektrophoretisch über ein Polyacrylamid/Harnstoff-Gel gereinigt.

c) PCRs und Klonierung einer Teil-cDNA-Sequenz

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde nach bekannten Protokollen durchgeführt (s. "Molecular Cloning", 2nd edition (1989), Sambrook, J. et al., CSH-Presse, Seite 14.1 ff.). Dazu wurde ein "DNA Thermal Cycler" der Firma Perkin Elmer benutzt. Dabei wurde das Prinzip der "verschachtelten Primer" nach Frohmann, M.A. et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002) verwendet und nach Fritz, J.D. et al. (Nucl. Acids Res. (1991) 19, 3747) modifiziert angewendet.

Im einzelnen wurde die cDNA aus a) mit jeweils 20 pmol der Oligonukleotide SEQ ID NO: 2 und dem synthetischen T7 Primer (abgeleitet aus p Bluescript II SK) ampliziert. Die Bedingungen waren dabei: 1'95°C; 3'72°C für 35 Zyklen.

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch auf einem 1,2%igen LMP-Agarose TBE-Gel aufgetrennt.

Aus dem Gel wurden über die gesamte Länge des "Schmiers" 5 Gelscheibchen geschnitten und diese als separate Fraktionen mit DNA-Fragmenten steigender Molmasse geschmolzen.

Aliquots dieser Fraktionen wurden dann separat in eine zweite PCR mit jeweils 20 pmol der Oligonukleotide ii) und dem synthetischen M13-20 Primer (abgeleitet aus p Bluescript II SK) eingesetzt.

Dabei überschritt der Agaroseanteil nie 1/10 Volumen des PCR-Ansatzes. Reaktionsbedingungen: 1'95°C; 2'50°C; 3'72°C für 35 Zyklen.

Die gelelektophoretische Auftrennung der Amplifikationsprodukte dieser Fraktionen ließ deutlich eine Reduzierung des komplexen Produktspektrums der ersten PCR hin zu einer definierten Bande nach der zweiten PCR erkennen.

Die solchermaßen selektrierten PCR-Produkte wurden nach Standardmethoden eluiert. Nach Subklonierung in die EcoRV-Schnittstelle des Vektors pBluescriptKS und Vermehrung des Plasmides in E.coli DH5alpha ergab die Sequenzanalyse eines Klones ein offenes Leseraster von 91 Aminosäuren (SEQ ID NO: 6), das mit der vorhergesagten Protein-Sequenz (SEQ ID:1) übereinstimmte.

Die DNA und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist in SEQ ID NO: 6 dargestellt.

d) Heterologe Expression

Zur heterologen Expression der 91 Aminosäuren langen Sequenz in E.coli wurden folgende Oligonukleotide synthetisiert:

Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO: 4
und
Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO: 5

Dabei leitet sich SEQ ID NO: 4 aus der Seq ID NO: 1 her; es entspricht der Sequenz für die Aminosäuren von Position 1 bis 14; SEQ ID NO: 5 leitet sich aus der Seq ID NO: 6 ab und entspricht der Sequenz des Gegenstranges für die Aminosäuren 87 bis 91 sowie dem Stop Codon. Die zusätzlichen 15 Nukleotide am 5'Ende von SEQ ID NO: 5 sollen eine Sal I Schnittstelle zu Klonierungszwecken rekonstituieren.

Eine PCR mit diesen beiden Oligonukleotiden und der in c) klonierten DNA als "template" führte zur Isolation einer cDNA-Sequenz, die die vollständige codierende Region des o.a. Thrombininhibitors (Seg ID NO: 6) beinhaltet. Die Reaktionsbedingungen waren 10 µl "template", jeweils 20 pmol der Oligonukleotide SEQ ID NO: 4 und SEQ iD NO:5; 1'95°C; 2' 55°C; 2' 55°C; 3'72°C für 35 Zyklen.

Das PCR-Produkt wurde mit Sal I nachgeschnitten, gelelektrophoretisch analysiert und nach Standardmethoden eluiert.

Zur heterologen Expresion in E.coli wurde das PCR Fragment in den induzierbaren und im Periplasma exprimierenden Vektor pMal-p2 der Firma New England Biolabs, Beverly, MA, USA (Katalog Nr. 800-65 S) subkloniert.

Hierzu wurde pMal-p2 mit Xmn I und Sal I verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Vektorbande nach Standardmethoden eluiert und mit dem PCR-Fragment ligiert.

Die Sequenz des neuen Thrombininhibitors (Seq ID NO: 6) wurde dadurch direkt an das 3'Ende des bakteriellen Gens für das Maltose-Binde-Protein (mal E) fusioniert.

Das Konstrukt wurde nach Standardvorschriften in den E.coli Stamm TB1 (New England Biolabs) transformiert.

Wachstum transformierter Zellen, Induktion mit IPTG und Aufarbeitung der Periplasmafraktion sowie Freisetzung des Thrombininhibitors durch Faktor Xa-Spaltung erfolgte genau nach den Angaben des Herstellers. Die einzelnen Schritte wurden durch SDS Gelelektrophorese analysiert.

Der rekombinant hergestellte Thrombininhibitor zeigte im Thrombinhemmtest eine Aktivität, die dem natürlichen Inhibitor aus Ornithodoros moubata voll vergleichbar war.

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

(A) NAME: BASF Aktiengesellschaft

(B) STREET: Carl-Bosch-Strasse 38

(C) CITY: Ludwigshafen

(E) COUNTRY: Bundesrepublik Deutschland

(F) POSTAL CODE (ZIP): D-6700

(G) TELEPHONE: 0621/6048526

(H) TELEFAX: 0621/6043123

(I) TELEX: 1762175170

(ii) TITLE OF INVENTION: Neues thrombininhibitorisches Protein aus Zecken

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 7

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(v) CURRENT APPLICATION DATA:

APPLICATION NUMBER:

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 33 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Ornithodoros moubata

(D) DEVELOPMENTAL STAGE: adult

(F) TISSUE TYPE: whole animals

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Peptide

(B) LOCATION: 1..33

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

```
Leu Asn Val Leu Cys Asn Asn Pro His Thr Ala Asp Cys Asn Asn Asp
1               5                  10                  15
Ala Gln Val Asp Arg Tyr Phe Arg Glu Gly Thr Thr Cys Leu Met Ser
            20                  25                  30
```

Pro

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: YES
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:
TGYAAYAAYC CNCAYACNGC 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: YES
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:
CCNCAYACNG CNGAYTGYAA 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 42 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:
TTGAATGTGT TGTCCAATAA TCCGCATACG GCCGATTGCA AC 42

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 33 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

GGGGGGGTCG ACGTGCTAGT ACCTTACATG TTT 33

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 291 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Ornithodoros moubata

(D) DEVELOPMENTAL STAGE: adult

(F) TISSUE TYPE: whole animals

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 1..277

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

```
TTG AAT GTG TTG TCC AAT AAT CCG CAT ACG GCC GAT TGC AAC AAT GAT      48
Leu Asn Val Leu Ser Asn Asn Pro His Thr Ala Asp Cys Asn Asn Asp
 1               5                  10                  15
GCA CAG GTT GAC AGA TAT TTT AGG GAG GGG ACA ACG TGC CTA ATG TCC      96
Ala Gln Val Asp Arg Tyr Phe Arg Glu Gly Thr Thr Cys Leu Met Ser
            20                  25                  30
CCA GCA TGC ACG AGC GAA GGA TAC GCC TCT CAG CAC GAA TGT CTC AGG     144
Pro Ala Cys Thr Ser Glu Gly Tyr Ala Ser Gln His Glu Cys Leu Arg
        35                  40                  45
CCT GCT TTG TTG GCG GGG AAG ACC ACA GCA GTG AAA TGC ACA GCT CAT     192
Pro Ala Leu Leu Ala Gly Lys Thr Thr Ala Val Lys Cys Thr Ala His
    50                  55                  60
GCC TTG GTG ACC CGC CCA CTT CCT GCG CGG AAG GCA CGG ACA TCA CCT     240
Ala Leu Val Thr Arg Pro Leu Pro Ala Arg Lys Ala Arg Thr Ser Pro
65                  70                  75                  80
ACT ACG ATT CTG ATA GCA AAA CAT GTA AGG TAC TAG C AGGTCGACCC        287
Thr Thr Ile Leu Ile Ala Lys His Val Arg Tyr  *
                85                  90
CCCC                                                               291
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 92 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: protein
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

```
Leu Asn Val Leu Ser Asn Asn Pro His Thr Ala Asp Cys Asn Asn Asp
 1               5                  10                  15
Ala Gln Val Asp Arg Tyr Phe Arg Glu Gly Thr Thr Cys Leu Met Ser
            20                  25                  30
Pro Ala Cys Thr Ser Glu Gly Tyr Ala Ser Gln His Glu Cys Leu Arg
        35                  40                  45
Pro Ala Leu Leu Ala Gly Lys Thr Thr Ala Val Lys Cys Thr Ala His
    50                  55                  60
Ala Leu Val Thr Arg Pro Leu Pro Ala Arg Lys Ala Arg Thr Ser Pro
65                  70                  75                  80
Thr Thr Ile Leu Ile Ala Lys His Val Arg Tyr  *
                85                  90
```

Patentansprüche

1. Protein mit thrombininhibitorischer Wirkung aus Zecken der Gattung Ornithodoros, dadurch gekennzeichnet, daß es einen isoelektrischen Punkt von pH kleiner als 3,8, ein Molekulargewicht von 8000 ± 1500 Dalton, bestimmt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und die N-terminale Aminosäuresequenz Leu-Asn-Val-Leu-Cys-Asn-Asn-Pro-His-Thr-Ala-Asp-Cys-Asn-Asn-Asp-Ala-Gln-Val-Asp aufweist.

2. Protein nach Anspruch 1 mit der in SEQ ID NO: 7 dargestellten Aminosäuresequenz.

3. DNA-Sequenz, die für ein Protein gemäß Anspruch 1 codiert.

4. DNA-Sequenz nach Anspruch 3 mit der in SEQ ID NO: 6 dargestellten Nukleotidsequenz.

5. Expressionsvektor, der eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 3 enthält.

6. Verwendung eines Proteins gemäß Anspruch 1 zur Bekämpfung von Krankheiten.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 92/02179

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.^{5} C12N15/15; A61K37/64; C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.^{5} C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, A, 9 104 275 (BASF AKTIENGESELLSCHAFT) 4 April 1991 (cited in the application) see claims 1,2 ---	1,6
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS) Vol. 265, No. 29, 15 October 1990, BALTIMORE, MD US pages 17746 - 17752 M. NEEPER ET AL. 'Characterization of Recombinant Tick Anticoagulant Peptide' see abstract ----------	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 December 1992 (04.12.92)	18 December 1992 (18.12.92)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. EP 9202179 SA 64691

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 04/12/92
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9104275	04-04-91	DE-A- 3931839	04-04-91
		EP-A- 0493494	08-07-92

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP 92/02179

Internationales Aktenzeichen

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)[6]

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Kl. 5 C12N15/15; A61K37/64; C12P21/02

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff [7]

Klassifikationssytem	Klassifikationssymbole
Int.Kl. 5	C07K

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen [8]

III. EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN [9]

Art.°	Kennzeichnung der Veröffentlichung[11], soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile[12]	Betr. Anspruch Nr.[13]
A	WO,A,9 104 275 (BASF AKTIENGESELLSCHAFT) 4. April 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1,2	1,6
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS) Bd. 265, Nr. 29, 15. Oktober 1990, BALTIMORE, MD US Seiten 17746 - 17752 M. NEEPER ET AL. 'Characterization of Recombinant Tick Anticoagulant Peptide' siehe Zusammenfassung	1-6

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen [10]:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgefuhrt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder menreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
04.DEZEMBER 1992	18. 12. 92
Internationale Recherchenbehörde	**Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten**
EUROPAISCHES PATENTAMT	THIELE U.H.

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9202179
SA 64691

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 04/12/92
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9104275	04-04-91	DE-A- 3931839	04-04-91
		EP-A- 0493494	08-07-92

EPO FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82