

59.013/SZE

K I V O N A T

Multimer hemoglobinek előállítása és alkalmazása

SOMATOGEN INC., BOULDER,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1992. 11. 06.

Elsőbbsége: 1991. 11. 08. (789,179),
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US92/09752

A nemzetközi közzététel száma: WO 93/09143

A találmány egy nem természetesen előforduló, pszeidotetramer hemoglobin-szerű protein azzal jellemezve, hogy négy globin-szerű domént tartalmaz, az említett pszeidotetramer két alapvetően homológ globin-szerű doménnel rendelkező pszeudodimer polipeptidet tartalmaz, melyek közül az egyiket úgy mutáltattuk, hogy az említett pszeudodimer polipeptid másik globin-szerű doménjében nem szereplő aszimmetrikus keresztköthető cisztein maradvékot biztosítson, az említett pszeidotetramer továbbá legalább egy másik globin-szerű domén-hordozó polipeptidet tartalmaz.

filles" are of

Bewies

PG4 01338

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

30402

"A"

59.013/SZE

S.B.G. & K.
Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1061 Budapest, Erzsébet kör. 10.
Telefon: 153-3723, Fax: 153-3664

Multimer hemoglobinok előállítás és alkalmazása

SOMATOGEN INC., BOULDER,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltalálók:

ANDERSON David, LAFAYETTE,

MATHEWS Anthony James, LOUISVILLE,

STETLER Gary L. BOULDER,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1992. 11. 06.

Elsőbbsége: 1991. 11. 08. (789,179),

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US92/09752

A nemzetközi közzététel száma: WO 93/09143

A Hoffman és Nagai (U.S.Ser. No. 07/194,338, 1988. május 10-én iktatott, most 5,028,588 számú US szabadalom, melyet a Somatogen Inc. birtokol) szabadalma az alacsony oxigén affinitású és más mutáns hemoglobinok vérpótló anyagokként való használatára vonatkozik, valamint az α és a β globin nem-erithroid sejtekben való expressziójára. Hoffman és Nagai (az 1989 december 1-én iktatott 07/443,950 számú US szabadalomban) leírnak bizonyos további dicisztein hemoglobin mutánsokat, mely szabadalom része a 07/194,338 számú szabadalomnak. Anderson et al. (HAEMOGLOBINS AS DRUG DELIVERY AGENTS 07/789,177 számú szabadalom, 1991, november 8-án iktatva) leírják a hemoglobinok gyógyszerekhez való konjugálását, mely a gyógyszer betegbe való bejuttatásának egy módszere.

A találmány háttere

A találmány területe

A jelen találmány multimer hemoglobin-szerű proteinekre irányul, melyek kettő vagy több genetikai fúzióval vagy kémiai keresztkötéssel egymáshoz kapcsolt pszeudotetramerekből állnak.

A tudományos háttér leírása

A. A hemoglobin szerkezete és funkciója

A hemoglobin a vér oxigént szállító alkotórésze. A hemoglobin a véráramban erithrocitáknak (vörösvértestek) nevezett kicsi

sejtmag nélküli sejtekben kering. A hemoglobin egy olyan protein, mely négy kapcsolódó polipeptid láncból áll, melyek a haemeknek ismert prosztetikus csoportot hordozzák. Az erithrocita segíti a hemoglobin redukált, funkcionális formájának fenntartását. A haem vas atomja érzékeny az oxidációval szemben, azonban ismét redukált állapotba hozható az erithrocitában levő két enzim rendszer a citokróm b_5 és a glutation redukciós rendszer egyikével.

A hemoglobin szerkezete jól ismert. A hivatkozás révén Bunn és Forget (Bunn and Forget (Eds.) Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects (W.B. Saunders Co. Philadelphia, PA:1986)) és Fermi és Perutz ("Hemoglobin and Myoglobin," in Phillips and Richards, Atlas of Molecular Structures in Biology (Clarendon Press:1981) teljes szövegét a találmányba építjük.

A normál felnőtt humán hemolizátum körülbelül 92 %-a Hgb A (alfa₂ béta₂-nek jelölt, mivel két alfa és két béta láncot tartalmaz). Más ismert hemoglobin típusok a következők: Hgb A₂ ($\alpha_2 \delta_2$), Hgb A_{1a}, Hgb A_{1b} és a Hgb A_{1c}, valamint az olyan ritka típusok, mint a Hgb F ($\alpha_2 \gamma_2$), Hgb Gower-1 (Zeta₂, epsilon₂), a Hgb Gower-2 (alfa₂ epsilon₂), Hgb Portland (Zeta₂ gamma₂) és a Hgb H (beta₄), valamint a Hgb Bart (gamma₄). Ezek a Hgb A-tól a polipeptid láncok eltérő szelekciójával különböztethetők meg.

Egy polipeptid elsődleges szerkezetét aminosav szekvenciája, valamint az egyes aminosavak oldalláncainak bármilyen módosításának azonosítása határozza meg. A "normál" humán hemoglobin alfa és béta globin polipeptid láncainak aminosav szekvenciáját az 1. Táblázatban adtuk meg. Számos mutáns forma ismert; számos mutánst azonosítottunk a 400. Táblázatban. A vad típusu alfa lánc 141 aminosavat tartalmaz. A haem (ferroprotoporfirin IX) csoport vas atomja kovalensen kapcsolódik a His 87 (a "proximális hisztidin") imidazoljához. A vad típusu béta lánc 146 maradék hosszú és

a haem a His 92-nél kapcsolódik hozzá. Az apohemoglobin a hemoglobin haem-mentes analógja; tulnyomórészt $\alpha\beta$ -globin dimerként létezik.

A polipeptid lánc szegmentjei a két gyakori konformáció, az alfa hélix és a béta lemez egyikévé alakításával stabilizálhatók. Nativ állapotában a hemoglobin molekula 75 %-a alfa helikális. Az alfa helikális szegmentek olyan szegmentekkel szeparálódnak el egymástól, melyekben a lánc sokkal kevésbé korlátozott. Hagyományosan az egyes láncok alfa helikális szegmentjeit betűkkel azonosítjuk, pl. az alfa lánc proximális hisztidinje F8 (az F helix 8-as maradéka). A nem-helikális szegmenteket betű párokkal azonosítjuk, jelezve, hogy melyik helikális szegmenteket tartalmazzák. Így a nem-helikális BC szegment a B és a C hélixek között található. Egy adott hemoglobin lánc két variánsának összehasonlításában segítséget adhat a helikális szegmentek sorbaállítása-nak megkísérelése, strukturális homológiák keresésekor. Az aminosav szekvencia és a helikális maradék jelöléshez, a normál humán hemoglobin A₀ alfa és béta láncokhoz lásd Bunn és Forget munkáját, és az 1. Táblázatot. A hemoglobin molekula terciér szerkezete azon aminosav maradékok szterikus kapcsolatára utal, melyek a lineáris szekvenciában egymástól távol helyezkednek el, míg a negyedleges szerkezet arra a módra utal, ahogy az alegységek (láncok) egymáshoz kapcsolódnak. A hemoglobin molekula terciér és negyedleges szerkezetét már elkülönítették a hemoglobin kristályok röntgen sugárzásos diffrakciós analízisével, mely lehetővé teszi, hogy meghatározzuk a molekula valóságos atomjainak három-dimenziós pozícióit.

Nem-oxigenált formájában ("dezoxi", vagy "T" a "merek"-nél) a hemoglobin A alegységek (alfa₁, alfa₂, béta₁ és béta₂) egy olyan tetrahedront képeznek, mely kétszeres axis szimmetriájú. Az

axis egy vízzel töltött "központi üregbe" fut le. Az alegységek egymással a Van der Waals erőkön, hidrogén hidakon és ionmos kölcsönhatásokon (vagy "sóhidakon") keresztül lépnek kapcsolatba. Az alfa1béta1 és az alfa2béta2 interfacek viszonylag rögzített állapotban maradnak az oxidálódás alatt. Ezzel szemben jelentős mozgás van az alfa1béta1 (és az alfa2béta1) interfaceken. Oxigénált formájában ("oxi" vagy "R" a "laza" forma esetében) az alegységek közötti távolságok megnőttek.

A nativ oxihemoglobin és a dezoxihemoglobin terciér és negyedleges szerkezetei megfelelően ismertek, szinte az összes nem hidrogén atom pozíciója 0.5 Angström pontossággal megállapítható vagy még pontosabban. A humán dezoxihemoglobinhoz lásd Fermi et al. munkáját (J. Mol. Biol. 175:159, 1984) és a humán oxihemoglobinhoz lásd Shaanan-t (J. Mol. Biol., 171:31, 1983), melyeket a hivatkozás révén a találmányba építettünk.

A normál hemoglobin ciszteinek tartalmaz a béta 93 (F9), a béta 112 (G 14) és az alfa 104 (G11) helyeknél. Ez utóbbi két pozíció mélyen bent található mind az oxi és a dezoxi állapotokban; közel fekszenek az $\alpha_1\beta_1$ interfacehez. Az oxi formában a béta 93 azonban reaktív szulfhidril reagensekkel.

A nativ humán hemoglobint teljes mértékben újraépítettük szeparált haem-mentes alfa és béta globinból és heminből. Előnyösen, először haemet adunk az alfa-globin alegységhez. Ezután a haemhez kapcsolódó alfa globint vetjük alá a haem-mentes béta alegységgel való komplex képzésnek. Végül haemet adunk a félig töltött globin dimerhez és így egy tetramer hemoglobint nyerünk. Yip et al., PNAS (USA) 74:64-68 (1977).

A humán alfa és béta globin gének sorrendben a 16 és 11 kromoszómákon található. Bunn és Forget infra a 172. oldalon.

Mindkét gént klónozták és szekvenálták, Liehaber et al., PNAS 77:7054-58 (1980) (alfa-globin genom DNS); Marotta et al., J. Biol. Chem., 252:5040-53 (1977) (béta globin cDNS); Lawn et al., Cell, 21:647 (1980) (béta globin genom DNS).

A hemoglobin 4 alegysége részvételével egyesített oxigén kötést mutat (a Hgb A esetében két alfa globin és két béta globin), és ez az együttes oxigénkötés jelentősen elősegíti a hatékony oxigén transzportot. Ez a szövetkezés, melyet az ugynevezett haem-haem kölcsönhatások biztosítanak, lehetővé teszi, hogy a hemoglobin változtassa az oxigénnel szembeni affinitását. A hemoglobin reverzibilisen kötődik 4 mol oxigén/mol Hgb arányban.

Az oxigént hordozó vegyületeket gyakran hasonlítjuk össze az oxigén disszociációs görbének ismert eszközzel. Ezt a görbét akkor kapjuk egy adott oxigén hordozó esetében, ha az oxigén szaturációt vagy az oxigén tartalmat ábrázoljuk az oxigén parciális nyomásával szemben. A Hgb esetében, a szaturáció százaléka egy szigmoid kapcsolatot mutatva nő a parciális nyomással. P_{50} az a parciális nyomás érték, melyen az oxigén hordozó oldat félig telítődik oxigénnel. Így ez az oxigén kötési affinitás mértéke; minél magasabb a P_{50} , annál lazábban kötődik az oxigén.

Ha egy oxigén hordozó oldat oxigén disszociációs görbéje olyan, hogy a P_{50} a teljes vérénél kisebb, "balra eltolódott"-nak hívják.

A hemoglobin oxigén affinitását csökkenti a 2,3-difoszfoglicerát (2,3-DPG), klorid ionok és hidrogén ionok jelenléte. A légzésben részt vevő szövetek széndioxidot szabadítanak fel a vérbe és így csökkentik annak pH értékét (azaz növelik a hidrogén ion koncentrációt), így arra kényszerítik az oxigént, hogy disszociáljon a hemoglobinnal és lehetővé váljon az egyes sejtekhez való diffúziója.

A hemoglobin azon képessége, hogy megváltoztatja oxigénhez való affinitását, a testben való oxigén transzport hatékonyságát fokozva, a 2,3-DPG metabolit jelenlététől függ. A vörösvérttesten belül a 2,3-DPG majdnem a hemoglobin koncentrációjával azonos koncentrációban van jelen. A 2,3-DPG hiányában a "hagyományos" hemoglobin az oxigént nagyon erősen köti és csupán kevés oxigént szabadítana fel a légzésben részt vevő szövetek számára.

Az öregedő vörösvérttest a vérplazmába kis mennyiségű szabad hemoglobint szabadít fel, ahol azt a haptoglobin tisztító protein gyorsan megköti. A hemoglobin-haptoglobin komplex kikerül a vérből és a lépben és a májban lebomlik.

Az izolált alfa globin láncok monomerek; nagy oxigén affinitást mutatnak, de természetesen hiányzik belőlük az alegység kooperativitás. Az izolált béta globin láncok β_4 tetramerek létrehozására aggregálódnak (HbH). A β_4 tetramer nagy de nem kooperáló oxigén affinitással rendelkezik.

B. Vérpótlószerek, Általában

Nem mindig helyes egy beteget adott vérrel transzfúziónak alávetni. Ezekben az esetekben vörösvérttest pótló anyag használata kívánatos. A termék a vörösvérttestekhez hasonlóan hatékonyan kell szállítsa az O_2 -t. (A "plazma expanderek", mint pl a dextrán és albumin nem szállítanak oxigént). A kétféle legszéleskörűbben vizsgált pótló anyagok a hemoglobin oldatok és a fluorokarbon emulziók.

A fenti kijelentésekből egyértelmű, hogy a szabad nativ hemoglobin A, közvetlenül a véráramba injektálva nem segitené

hatékonyan az oxigén transzportot a testben. A létfontosságú alloszterikus szabályozó, a 2,3-DPG, nincs elegendő koncentrációban jelen a plazmában ahhoz, hogy sok oxigént szabadítson fel vénás oxigén nyomásnál.

Azonban hagyományos hemoglobin oldatokat használtak RBC pótlékokként. A hemoglobin oldatok előállításának klasszikus módszere lejárt vért használ fel. A vörösvértesteket lizálják és a sejt hulladékot eltávolítják, így remélhetőleg marad a "sztroma-mentes hemoglobin" (SFH).

Ezzel a módszerrel kapcsolatban azonban számos problémát figyeltek meg. Az oldat mentes kell legyen a vörösvérsejt membrán toxikus alkotórészeitől anélkül, hogy kényelmetlen és fárasztó eljárásokat kellene alkalmazni, mely elriasztana a nagyüzemi termeléstől. DeVenuto, "Appraisal of Hemoglobin Solution as a Blood Substitute", Surgery, Gynecology and Obstetrics, 149:417-436 (1979).

Másodszor, ahogy az várható, az ilyen oldatok "balra-tolódottak" (alacsony a P_{50} érték) a teljes vérhez viszonyítva. Gould et al., "The Development of Polymerized Pyridoxilated Hemoglobin Solution as a Red Cell Substitute", Ann. Emerg. Med. 15:1416-1419 (1986, dec. 3.). Ennek eredményeként az oxigén affinitás túl magas ahhoz, hogy elegendő oxigént juttasson a szövetekhez. Benesch and Benesch, Biochem. Biophys. Res. Comm., 26:162-167 (1967).

Harmadszor, az SFH csupán korlátozott felezési idővel rendelkezik a keringési rendszerben. Ez azért van, mert az oxigén Hgb részlegesen egy olyan dimerré ($\alpha\beta$) disszociál, mely gyorsan kitisztul a vérből a glomeruláris szűrés és a keringő haptoglobulinhoz való kötődés révén. Ha a keringésbe nagy mennyiségű oldható hemoglobint juttatunk a dimerek glomeruláris szűrése

protein és vas terhelést jelent a veséknek, vesekárosodást okozva. Bunn, H.F., et al. (1969) The renal handling of hemoglobin I. Glomerular filtration. J.Exp. Med. 129:909-923; Bunn, H.F. and J.H. Jandl (1969) The renal handling of hemoglobin II. Catabolism. J. Exp. Med. 129:925-934; Lee, R.L. et al., (1989) Ultra-pure, stroma-free, polymerized bovine hemoglobin solution: Evaluation of renal toxicity (blood substitutes) J. Surgical Res. 47:407-411; Feola, M. et al., (1990) Nephrotoxicity of hemoglobin solutions. Biomat. Art. Cell. Art. Org., 18(2):233-249; Tam, S.C. and J.T.F. Wong (1988) Impairment of renal function by stoma-free hemoglobin in rats J. Lab. Clin. Med. 111:189-193.

Végül, az SFH nagy kolloid ozmotikus nyomással rendelkezik (COD). Így az SFH olyan dózisban való adagolása, mely ugyanolyan oxigén hordozó kapacitással rendelkezne mint egy egység becsomagtolt vörösvértest nem javasolt, mivel a magas ozmotikus nyomás (60 mm Hg) erős a sejtekből a véráram felé irányuló víz kiáramlást eredményezne így dehidratálná a beteg szöveteit. Ez a szempont korlátozza az SFH dózisát, így a végső koncentráció megközelítően 6-8 gm Hgb/dl dózist biztosít.

Egy a kívánt P_{50} visszaállítására irányuló kísérletben a kutatók 2,3-DPG-t adtak a hemoglobin oldathoz. Sajnos a 2,3-DPG hamar eltűnt a keringésből. A kutatók ezután más szerves foszfátokhoz, különösen a piridoxin foszfát felé fordultak. A 2,3-DPG-hez hasonlóan ezek a vegyületek stabilizálják a Hgb "T állapotát" a két béta lánc N-terminálisai közötti sóhidak létrehozásán keresztül. Ezen piridoxilált hemoglobin 20-22 torr P_{50} értékkel rendelkezik a 10 torr-os SFH-hoz és a 28 torr-os teljes vérhez képest. Míg ez előrelépést jelent az SFH-hoz képest, a piridoxilált Hgb "nagy affinitásu" marad a teljes vérhez képest.

C. A (nem polimerizáló) hemoglobin természetesen előforduló
cisztein helyettesítésű mutánsai

Létezik a humán hemoglobinnak néhány ismert természetesen előforduló mutánsa, melyekben cisztein maradékkal helyettesítjük a normál hemoglobin A α másik maradékát.

A hemoglobin Nigeriában, a mutáció α 81 Ser $\rightarrow$ Cis; diszulfid nem keletkezik. Haris et al., Blood 55(1):131-137 (1980). A hemoglobin Rainierben egy intraaalegység keletkezik a vad típusu F9 (93) Cisztein és a HC2(145) β -nál a Tyr helyettesítésével bejuttatott cisztein között. Greer, et al., Nature [New Biology], 230:261-264 (1971). A hemoglobin Nunobiki (β 141 Drg $\rightarrow$ Cys) szintén egy nem polimerizáló cisztein helyettesítést jellemez. A hemoglobin Rainierben és a Hb Nunobikiben az új cisztein maradékok a tetramer felületén vannak.

D. Természetesen előforduló polimerizáló vagy polimer hemoglobi-
nok

Három másik humán mutánst ismerünk, melyek az intermolekuláris (az első tetramertől a második tetramerig) diszulfid hidak képződése eredményeként polimerizálódnak. A hemoglobin Porto Alegre-ben a Ser-t (az A6(9) β -nál) cisztein helyettesíti és mivel ez a cisztein maradék externális orientációjú, spontán polimerizáció fordul elő és a három diszulfid kötéssel kapcsolódó Porto Alegre tetramer dódekamerre való alakulását eredményezi.

Egy oktamert hoztak létre a Porto Alegre hemoglobin és egy normál hemoglobin 1:1 arányú keverésével. Tondo, Biochem. Biophys. Acta, 342:15-20 (1974); Tondo, An. Acad. Bras. Cr., 59:243-251 (1987).

A hemoglobin Mississippi-t a Ser CD3(44) β helynél egy cisztein helyettesítés jellemzi. Egy beteg hemolizátumait gélszűrési oszlop kromatográfiának vetették alá és 48.8 %-a eluált az érvénytelen térfogatban. Mivel a molekulasúly exklúzió megközelítően 600 kD, ez azt sugallja, hogy a Hb MS polimerek 10 vagy több hemoglobin tetramerből állnak. Adams et al., Hemoglobin, 11(5):435-452 (1987).

Egy β 83(EF7)Gly $\rightarrow$ Cys mutáció jellemzi a hemoglobin Ta Li-t. Ez a mutáns kis mobilitást mutat keményítő gél elektroforézis esetében, ami azt jelzi, hogy ez egy polimer.

Polimer egér hemoglobinokról is született már beszámoló. A BALB/cJ egerekben van egy reaktív ciszteinil maradék a béta lánc (β -13 az egérben) NH₂-terminálisához közel. Ezt az egér mutánst hasonlították a Hemoglobin Porto Alegre-hez, mely hasonlóképpen rendelkezik egy ciszteinil maradékkal a béta lánc A-hélixében. Leggyakoribb az okotamer képződés. Azonban az egyes tetramerek két extra ciszteinil maradékkal rendelkeznek, az egyes béta láncon eggyel, mely reakcióba léphet különböző tetramerekkel; "ez magyarázatot ad arra, hogy miért fordulnak elő oktamernél nagyobb aggregátumok". Benaventura and Riggs, Science, 149:800-802 (1967); Riggs, Science, 147:621-623 (1965).

Macaques szintén bemutat egy polimerizáló hemoglobin variánst. Takenaka, et al., Biochem. Biophys. Acta, 492:433-444 (1977); Ishimoto, et al., J. Anthrop. Soc. Nippon, 83(3):233-243 (1975). Ezt a mutánst emberekben vetettük össze a Ta Li variánssal.

A kétéltűek és a hüllők is rendelkeznek polimerizáló hemog-

lobinokkal. Például a kecskebékában a hemoglobin "C komponens" polimerizálódik tetramerek közötti diszulfid kötés létrehozásán keresztül. Azt állítják, hogy ez elsődlegesen az alfa lánc ciszteinil maradékaitól függ. Tam et al., J. Biol. Chem., 261:8290-94 (1986).

A földigiliszta (Lumbricus terrestris) extracelluláris hemoglobinja komplex szerkezetű. Tizenkét alegység van, melyek mindegyike dimer szerkezetű $(abcd)_2$, ahol "a", "b", "c" és "d" a haemet tartalmazó fő láncot jelölik. Az "a", "b" és "c" láncok egy diszulfid kötésű trimert hoznak létre. A teljes molekula 192 haemet tartalmazó láncból és 12 haemet nem tartalmazó láncból áll és molekulásúlya 3800 KDa. A többi gerinctelen hemoglobin is hatalmas sok alegységből álló protein.

A tengeri rák Artemia három polimer hemoglobint termel kilenc genetikailag fuzionált globin alegységgel. Manning et al., Nature, 348:653 (1990). Ezeket két eltérő alegység típus, a és b β , különböző kapcsolódásai hozzák létre. A nyolc interalegység kötő közül hat 12 maradék hosszú, egy 11 maradék hosszúságú és egy 14 maradék hosszú.

E. Mesterségesen keresztkötött hemoglobinok (nem polimerizáló)

A hemoglobin tulajdonságait megváltoztatták az alfa láncok alfa1 Lys99-e és az alfa2 Lys99-e közötti specifikus kémiai keresztkötésével. Walder, U.S. 4,600,531 és 4,598,064; Snyder et al., PNAS (USA) 84:7280-84 (1987); Chatterjee et al., J. Biol. Chem. 261:9927-37 (1986). A béta láncot is kémiai keresztkötésnek vetették alá. Kavanaugh et al., Biochemistry, 27:1804-8 (1988),

Kavanaugh megjegyezte, hogy a béta N-terminusok 16 Å távolságra vannak a T állapotban és 20 Å távolságra az R állapotban. Nem meglepő, hogy egy DIDS hid bejuttatása a T állapotú hemoglobin N terminusai közé megakadályozza az R állapotba való elmozdulást, így csökkentve a molekula O_2 affinitását. Míg a Kavanaugh analóg kívánatos oxigén kötéssel és vese tisztítási tulajdonságokkal rendelkezik alacsony hozamban lehet kinyerni.

Hoffman és Nagai USP 5,028,588 azt állítják, hogy a hemoglobin T állapota stabilizálható interalegység (de nem intratetramer) diszulfid keresztkötésekkel, melyek a maradékok cisztein maradékokkal való helyettesítéséből származnak. Egy különösen előnyben részesített keresztkötés volt az, mely a béta Gly Cys-t kötötte össze az alfa G17-tel (Ala $\rightarrow$ Cys) vagy a G18-cal (Ala $\rightarrow$ Cys).

F. Mesterségesen keresztkötött hemoglobin (polimerizáló)

Bonsen, USP 4,001,401, USP 4,001,200 és az USP 4,053,590 szabadalmi mind a vörösvérsejt eredetű hemoglobin kémiai keresztkötéssel való polimerizációjával vannak kapcsolatban. A keresztkötést bifunkcionális vagy polifunkcionális keresztkötő anyagok segítségével érték el, különösen olyanokkal, melyek reaktívak a globin láncok kitett aminocsoportjaival. A keresztkötéses reakció eredménye kovalensen keresztkötött aggregátumok polidiszperz készítménye.

Bonhard, USP 4,336,248 leírja a hemoglobin molekulák egymáshoz vagy szérum proteinekhez, mint az albuminhoz való kémiai keresztkötését.

Bonhard, USP 4,777,244 kidolgozta a dialdehid-kereszt-kötésű hemoglobinok stabilizálását, melyek tendenciát mutattak a tárolás alatti tovább polimerizálódásra, ha egy redukáló anyagot adtak hozzá az azometin kötés stabilizálása céljából.

Bucci, USP, 4,584,130 2. oszlop, azt a megjegyzést tette, hogy "a polihemoglobin reakciótermékek különböző molekula típusok heterogén keverékét jelentik, melyek méretben és alakban is eltérőek. Ezek molekulaszúlya 64,500 - 600,000 Dalton közötti. Az egyes molekula típusok szeparálása a heterogén keverékből gyakorlatilag lehetetlen. Továbbá, bár hosszabb retenciós időket kapunk in vivo, polihemoglobinokat használva ezek oxigén affinitása magasabb mint a sztróma-mentes hemoglobiné."

Tye szerint, USP 4,529,179, "a legtöbben a hemoglobin random intermolekuláris keresztkötésű polimerjeit választják, mert úgy vélik, hogy a 65,000 Dalton méretű tetramert a glomerulusok kiszűrjük... Általában a hemoglobin molekula felületén levő lizin amino csoportjai egy bifunkcionális reaktív anyaggal kapcsolódnak, mint pl. glutáraldehiddel vagy szuberimidáttal. 42 lizin vehet részt a reakcióban hemoglobin tetramerenként így korlátlan számú különböző inter [vagy] intra molekuláris keresztkötés jöhet létre, a hemoglobin különböző polimerjeit hozva létre... A random polimerizációt nehéz szabályozni, és 2-10 tetramert eredményez polimerenként... Eddig senki nem standardizált analitikai sémát a szerkezet és funkció sokféle variabilitásának megállapítására.... [a polimerizált piridoxilált hemoglobin] az alapos kémiai heterogenitás megnehezíti gyógyszerészeti anyagként való vizsgálatát."

G. Fuzionált gének és proteinek, Általában

A gének egymáshoz fuzionáltathatók, az első gén stop kódonjának eltávolításával és annak a második génhez való kapcsolásával. A gének részei szintén fuzionáltathatók és a szakaszt fenntartó spacer DNS-ek toldhatók a fuzionált szekvenciák közé. A fuzionált gén terméke egy egyedüli polipeptid, nem pedig polipeptidek sokasága, mivel egy policisztronos operon expresszálja. lönböző géneket fuzionáltattak számos célból. Így Gilbert, U.S. 4,338,397 patkány preproinzulin gént inzertált az E. coli penicillináz gén fragmentje után. Célja az volt, hogy az E. coli transzformánsokat a fuzionált gén expressziós termékének szekretálására irányítsa. Fuzionált géneket hoztak létre azért, hogy a nem antigenikus polipeptid már egy immunogenikus hordozó proteinhez konjugálva expresszálódhasson.

Ismeretes a kötő DNS szekvenciák két eltérő DNS szekvencia összekötésére való használata is. Ezeket a kötőket a DNS hasításhoz való restrikciós helyek biztosítására használják vagy egy egyedi tulajdonsággal rendelkező peptidek kódolására, melyek a kódolt fúziós protein vagy annak egy fragmentje tisztítását segítik elő. Lásd pl. Rutter, U.S. 4,769,326.

Hallewell, et al., J. Biol. Chem., 264:5260-68 (1989) létrehozta a CuZn szuperoxid diszmutáz egy analógját. Az egyes diszmutáz molekulák két azonos alegységből álló dimerek; egy réz ion és egy cink ion kötődik az alegységhez. A dimer kölcsönhatás olyan erős a CuZn szuperoxid diszmutázban, hogy az alegységeket nem különítették el az enzim inaktiválása nélkül. Az enzim jelentős konformációs hasonlóságot mutat az immunoglobulinokkal; Hallewell, et al., két humán szuperoxid diszmutáz gént kapcsolt össze, közvetlenül, vagy egy 19 maradékból álló humán immunoglo-

bulin IgA1 sarok régiót kódoló DNS-sel, majd a fuzionált gént egy transzformált gazdában expresszálta. A közvetlenül kapcsolt gének expresszálásának megkísérlésében a rekombináció úgy következett be, hogy eltávolította a tandem gének egyikét néhány plazmid molekulában. Hallewell, et al., feltételezte, hogy a közvetlen összekapcsolás elfordítja a dimert, így a hidrofób régiók kitetté vélnak és ez azután toxikus hatást eredményez. Ez szelekciós nyomást eredményezhetett volna, mely kedvez a gén deléciójának. Rekombinációt nem figyeltek meg az IgA1 kötő szerkezettel kapcsolatban.

Hoffman, et al., WO88/09179, leírják a hemoglobin és analógjainak baktériumokban és élesztőgombában való termelését. A leírt analógok közé olyan hemoglobin proteinek tartoznak, melyekben az egyik komponens polipeptid lánc két alfa vagy két béta globin aminosav szekvenciát tartalmaz peptid kötések keresztül kovalensen kapcsolódva, előnyösen egy vagy több aminosavból álló közvetítő kötőn keresztül, elágazás nélkül. A normál hemoglobinban az alfa és a béta globin alegységek nem kovalensen kapcsolódnak.

A találmány összefoglalása

A találmány olyan multimer hemoglobin-szerű proteinekre vonatkozik, melyekben két vagy több tetramer vagy pszeudotetramer kovalensen kötődik. A kovalensen kapcsolódó tetramer párok bármelyike között a kovalens kötés keresztkötés formáját veheti fel a különböző polipeptid láncok cisztein maradékai között, vagy egy peptid kötőét, mely az egyik tetramer globin-szerű "karboxi

többségű" maradékát köti össze egy második tetramer hasonló doménjének "amino többségű" maradékával

Előnyösen, a multimer hemoglobin-szerű proteint tartalmazó összetétel legalább 50 %-ban monodiszperz, még előnyösebben legalább 95 %-ban monodiszperz.

Bár a természetes forrásokból származó szabad hemoglobin polimerizálható kémiai keresztkötéssel a felezési idő növelése céljából a megnövekedett molekulasúlyon keresztül, valamint az ozmotikus nyomás csökkentése céljából, az összes ilyen készítmény heterogén. A monodiszperzitás csupán fáradtságos tisztítással érhető el.

A jelen találmány eszközöket biztosít a hemoglobin tetrame-
rek polimerizációs foka feletti szigorú ellenőrzés gyakorlásához. A multimerek képződésének szigorú ellenőrzési képessége nagyban elősegíti a végtermék tisztítását és jellemzését, valamint csökkenti a kisebb alkotórészek irányába való káros reakciókat. Ugy véljük, hogy egy fokozottabban monodiszperz összetétel egy következetesebb klinikai hatást mutat.

A hemoglobin előállítható az alfa és a béta globin génnek azonos vagy eltérő gazdasejtekben való expressziójával, majd az expresszált alfa és béta globinok ezt követő haemmel való összeállításával a hemoglobin létrehozása céljából. Míg a megfelelő Cys kódon mutációk bejuttatása kedvez a keresztkötésű multimer hemoglobin termelésének, az expressziós termék általában nem lesz alapvetően monodiszperz. A hemoglobin két alfa és két béta globin alegységből áll. Az alfa globin alegységek eredetileg egy egyedüli alfa globin génből expresszálódnak és a béta globin alegységek egy egyedüli béta globin génből. Így, ha egy egyedüli Cys kódon szubsztituciót tartalmazó alfa globin gén expresszálódik, az összeállított tetramer két alfa globin alegységet fog

tartalmazni mindegyikben egy keresztkötésben részt vehető Cys-szel. Egy Cys keresztkötődhet egy második tetramerhez, a másik egy harmadikhoz, így egy több tagú oligomer képződését eredményezi.

Egy megvalósulásban, a multimer protein egy alapjában véve két kovalensen keresztkötődő tetramerből álló oktamer. A nem kívánatos polimerizáció elkerülése céljából mindegyik tetramer csupán egy egyedül részt vevő ciszteinil maradékot tartalmaz, melynek tiol csoportjai vagy egymással reagálnak (oxidáló körülmények között, diszulfid kötést létrehozva) vagy egy tiol-reaktív keresztkötő anyaggal, a keresztkötés létrehozása céljából.

A két globin-szerű domént tartalmazó egyedüli polipeptidet kódoló fuzionált gén mutáltatható oly módon, hogy egy külső keresztköthető Cyst biztosítson a kapott pszeudodimer polipeptidnek két máskülönben azonos doménjének csupán egyikében. Ez a pszeudodimer állítható össze a komplementer alegységekkel az egyedüli ciszteint tartalmazó tetramer létrehozása céljából. Két ilyen tetramer végül keresztköthető az oktamer nyerése céljából, előnyösen alapjában véve monodiszperz formában.

Ha többtagu multimer mint pl. a dódekamer képződését tervezzük, a pszeudotetramer összetevők - melyek mindegyike rendelkezik egy egyedüli externálisan keresztköthető ciszteinnel - kovalensen kapcsolódnak a polifunkcionális keresztkötő egy reaktív helyéhez, így megfelelő felezési idővel rendelkeznek a véráramban.

Két vagy több pszeudotetramer keresztkötése helyett egy multimer hemoglobin nyerésének egy másik módja pszeudodimer alegységeik egyesítése egy egyedüli pszeudooligomerré, melyben részt vesz a multimer hemoglobin minden pszeudotetramer komponen-

se. Például egy peptid kötésekkel kovalensen kapcsolódó (tipikusan egy peptid spacerrel) nyolc alfa globin-szerű domént tartalmazó pszeudooktamer polipeptid összeállítható nyolc egyedüli béta globin-szerű alegységgel egy tetra-tetramer humán hemoglobinszerű protein létrehozása céljából. A többtagú multimerek létrehozhatók a megfelelő pszeudooligomer egyszerű expresszáásával majd a komplementer monomer alegységekkel való összeépítéssel.

A multimer hemoglobinok genetikailag fuzionált pszeudooligomer gerinccel való előállítása elkerüli a kémiai keresztkötés hátrányait. Ez utóbbi eredménytelen és gyakran a hemoglobin oldat oxigénelvonását teszi szükségessé valamint egy másik molekula jelenlétét (pl. inozitol hexafoszfát vagy 2,3-DPG) a versenyreakciók elkerülése céljából.

A fent megvitatott megvalósulásban egy alapjában véve monodiszperz multimer hemoglobint nyerünk ha az externálisan keresztköthető ciszteinek számát egyre korlátozzuk tetramerenként. Azonban lehetőség van arra, hogy egynél több externális keresztköthető cisztein legyen tetramerenként, feltéve hogy helyzetük olyan, hogy miután egy idegen tetramerhez kötődött az egyik, más idegen tetramerek szterikusan gátolva vannak az eredeti tetramer fennmaradó ciszteinjeihez való keresztkötéstől.

A találmány multimer proteinjei, különösen magasabb polimerizációs szinteken, meghosszabbíthatják a rekombináns hemoglobin felezési idejét az érből való kilépés és a disszociált alegységek glomeruláris szűrésének csökkentése révén in vivo a natív humán hemoglobinhoz viszonyítva. A felezési időre, mint a makromolekuláris méret funkciójára vonatkozó tanulmányok azt jelzik, hogy összefüggés van a megnövekedett méter és a megnövekedett keringési felezési idő között a kémiaailag keresztkötött Hb valamint más makromolekulák esetében. Előnyösen, emberekben, a felezési idő

meghaladja a 9 órát az 1 gm/kgm testsúly dózisok esetében. Ez várhatóan megfelel a kb. 3 órás felezési időnek olyan patkányok esetében, melyek összehasonlítható dózist kaptak.

Az intravasculáris retenció is fokozható a tetramer kereszt-kötődő helyek oly módon való manipulálásával, hogy a tetramerek haptoglobín kötő helyeit teljesen vagy részben elzárjuk. Független mutációk is végezhetők a haptoglobín kötés szterikus gátlására, vagy az olyan anyagok közelítésének elektrosztatikus háritására vagy szterikus akadályozására, melyek bontják a kereszt-kötést.

A találmány multimer proteinjei növelhetik a daganatos nyomást is, mivel az oxigén kötő haem csoportok száma "n" tagu politetramerenként "n"-szerese a tetramerenkénti számnak. A mérettől függetlenül az daganatos nyomás politetramer Hb oldatban levő haem csoportok egy adott koncentrációja esetében várhatóan (1/n)-szerese a tetramer Hb-ben levő haem ekvimoláris oldatában levőnek. A daganatos nyomás miatt a véráramba juttatható szabad tetramer Hb maximális koncentrációja kisebb a térfogathoz viszonyított alapon, mint az érintetlen vörösvérsejtben normálisan szállított Hb koncentrációja. A daganatos nyomás csökkentése ezért hasznos a vérpótló készítmény térfogatonkénti oxigén szállító kapacitásának növeklése szempontjából.

Egy előnyben részesített megvalósulásban, egy vagy több globin-szerű domén tartalmaz olyan mutációkat, melyek csökkentik a hemoglobin analóg oxigén kötő affinitását oldatban, abból a célból, hogy megközelítsük a teljes vér oxigén-kötő tulajdonságait.

A rajzok rövid leírása

1. ábra A pSGE1.1E4 plazmid. Ez a plazmid egy policisztronos operont hordoz, mely a pTAC promótert, valamint egy di-alfa globint és egy béta globint kódoló gént tartalmaz. Hordoz tetra-ciklin és ampicillin rezisztencia géneket is és a lacI gént.

2. ábra A (des-Val)-alfa-(Gly)-alfa és des-Val béta globin expressziójára szolgáló előnyben részesített szintetikus gén szekvenciáját [1. számú szekvencia] mutatja. Ezt a gént a pSGE1.1E4 hordozza. A a Shine-Delgarno riboszóma kötő helyeket (SD#1 és SD#2) tartalmazó régiót (EcoRI - PstI), az oktapeptidet (Met...Glu) expresszáló, kotranszlációs couplerként szolgáló szekvenciát (25. számú szekvencia), valamint két majdnem azonos alfa globin-szerű peptidet kódoló szekvenciát és a közbetoldott Gly-Gly kötőt mutatja. Az első alfa globin szekvencia "Met-Leu"-val kezdődik, azaz egy mesterségesen létrehozott változással metionint tartalmaz, kihagyja a valint, mely normálisan az érett alfa globin első maradéka és a második maradékkal a leucinnal folytatódik. A maradékokat 1-141-ig számoztuk (26. számú szekvencia). A második alfa globin szekvencia "Val-Leu"-val kezdődik, közvetlenül az aláhúzott "Gly-Gly" kötő után. A maradékokat 1' - 141'-vel jelöltük (27. számú szekvencia). A start és stop kódonokat aláhúztuk. B a des-Val béta globin kódoló szekvenciáját tartalmazó (Pst - HindIII) analóg régiót mutatja. A béta maradékokat 1 -146-ig számoztuk (28. számú szekvencia). Az A és a B a PstI helynél kapcsolódnak egy egyedüli policisztronos operon létrehozása céljából. Ha egy 3 betűből álló aminosav kódot egyszer aláhúzunk, azt jelzi, hogy a

maradék egy potenciális hely a Xaa → Cys mutációhoz, egy keresztköthető hely biztosításához. A mutációkat aszimmetrikusan kell elvégezni, azaz a di-alfa vagy di-béta gén csupán egy régiójában, így csupán egy keresztköthetést adunk tetramerenként. Míg, a 2. ábrában a helyeket csupán az alfa gén első kópiáján jelöltük, ezek lehetnek a második kópián is. A kényelem kedvéért a megfelelő béta globin mutációs helyeket is megjelöltük. Azonban, ezeket a mutációkat egy di-béta globin gén csupán egyik béta globinjában szabad elvégezni.

A kettős vonallal aláhúzott aminosav kódok olyan helyeket jelölnek, ahol a két diszulfid kötés (vagy alegységenként) képződése szterikusan gátolható, így egy di-alfa vagy egy di-béta szerkezet használata nem szükséges.

Azokat a maradékokat, melyek a haptoglobín kötés gátlására szolgáló mutációk feltételes helyei bekereteztük.

3. ábra a pszeudooktamer Hgb egy formájának stilizált képviselője, ahol az oktamer hemoglobin egy aszimmetrikus di-alfa Hgb két molekulájának kötődésével vagy keresztköthetődésével jön létre.

4. ábra (a) négy vagy (b) hat Hgb tetramer összekapcsolásához megfelelő felcsavart keresztköthetőket mutat.

5. ábra Sematikusan mutatja be, hogyan segíthetik a cisztein mutációk az oktamer képződést az alegységek genetikai fúziója nélkül.

6. ábra A feltételezett alfa₁-béta₁ globin pszeudodimer.

Az előnyben részesített megvalósulások részletes leírása

Meghatározások

Egy hemoglobin olyan protein, mely haemet (ferroprotoporfirin IX) tartalmaz és ez a respirációs felületen (bőr, kopoltyú, trachea, tüdő, stb) oxigént köt és az oxigént a belsőbb szövetekhez szállítja, ahol az felszabadul és az anyagcserében felhasználásra kerül. A természetben az alacsonyabb molekulasúlyú hemoglobinok (16-120 kilodalton) találhatók a keringő vörösvérsejtekben, míg a nagyobb polimer hemoglobinok szabadon keringenek a vérnyirok vérében.

A csatolt igénypontok céljaihoz egy hemoglobin-szerű protein egy a következő tulajdonságokkal rendelkező protein:

- (a) kellőképpen oldódik vérben ahhoz, hogy klinikailag használható vérpótló anyagként szolgálhasson;
- (b) reverzibilisen köti az oxigént fiziológiás körülmények között;
- (c) mindegyik polipeptid lánc tartalmaz legalább egy globin-szerű domént (ahogy azt a későbbiekben meghatároztuk) és,
- (d) mindegyik globin-szerű domén hordoz (vagy képes beépíteni) egy haem prosztetikus csoportot;

A multimer hemoglobin-szerű proteint a továbbiakban a következők jellemzik:

- (e) két vagy több polipeptid láncból áll;
- (f) két vagy több tetramerből áll, az egyes tetramerek négy globin-szerű domént tartalmaznak és
- (g) az egyes tetramer alkotók kovalensen kapcsolódnak legalább egy másik tetramer alkotórészhez.

Előnyösen a találmány hemoglobin-szerű proteinjai 2-45 torr p_{50} értékűek, még előnyösebben 24-32 torr 37 °C hőmérsékleten vérben. Előnyösen mutatnak valamilyen kooperációs fokot is. Kivánatos, hogy legyen intravasculáris retenciójuk is, legalábbis a normál humán hemoglobinéhoz hasonlítható vérpótló anyagként alkalmazva.

A tetramer hemoglobin-szerű proteinek négy globin-szerű doménnel rendelkeznek, az oktamer hemoglobin-szerű proteinek nyolc globin-szerű doménnel és így tovább. A "multimer" fogalom bármely olyan hemoglobin-szerű proteinre vonatkozik, mely $(4 \times n)$ globin-szerű domént tartalmaz, ahol $n > 1$.

Egy pszeudomer hemoglobin-szerű protein olyan protein ahol a globin-szerű domének száma nagyobb, mint az alkotórész polipeptid láncok száma, azaz legalább egy lánc tartalmaz legalább két globin-szerű domént. A pszeudoheterotetramer hemoglobin-szerű proteinek például állhatnak (a) egy di-alfa globin-szerű és két béta globin-szerű polipeptidből, (b) két alfa globin-szerű és egy di-béta globin-szerű polipeptidből, (c) egy di-alfa globin-szerű és egy di-béta globin-szerű polipeptidből, (d) egy fuzionált

alfa/béta globin-szerű polipeptidből és egy különálló alfa és béta globin-szerű polipeptidből, vagy (e) két fuzionált alfa/béta globin-szerű polipeptidből. A "tetramer" fogalma magába foglalja a "pszeudotetramereket".

Egy "genetikailag fuzionált hemoglobin" egy olyan hemoglobin-szerű protein, mely tartalmaz legalább egy "genetikailag fuzionált globin-szerű polipeptidet", (globin pszeudooligomer), ez utóbbi tartalmaz két vagy több globin-szerű domént, melyek lehetnek azonosak vagy eltérők és melyek közvetlenül kapcsolódnak vagy aminosav vagy peptid kötőközön keresztül. Egy di-alfa globin-szerű polipeptid olyan peptid, mely tartalmaz alapjában véve két az első alfa-globin-szerű polipeptid (domén) normális C-terminusa és egy második alfa-globin-szerű-polipeptid (domén) N-terminusa között levő peptidkötéssel összekapcsolt alfa-globin-szerű polipeptid szekvenciákat (doméneket). Ez a két szekvencia lehet közvetlenül kapcsolt vagy egy vagy több aminosav peptid kötőjén keresztül kapcsolt; a "peptid kötés" fogalma mindkét lehetőséget magába foglalja. Az N- és a C-terminusnál a peptid köréstől eltérő (DIDS-szel) módon keresztköötött alfa globin láncok nem di-alfa globinok. A di-alfa globin-szerű polipeptid képes kell legyen a béta globinnal való összehajlásra és a haem beépülésére a funkcionális hemoglobin-szerű protein létrehozásához. A di-béta globin-szerű polipeptid analóg módon határozható meg. A csupán az egyik alkotórész doménben mutációval rendelkező di-alfa vagy di-béta globin-szerű polipeptidet hívjuk "aszimmetrikusnak".

Lehetséges egy "alfa/béta-globin-szerű pszeudodimer" biztosítása is, ahol egy alfa globin-szerű szekvenciát kapcsolunk peptid kötésekkel egy béta globin-szerű szekvenciához. Erre az "alfa/béta globin-szerű polipeptid" és a di-alfa és di-béta

globin-szerű polipeptidekre kollektíven hivatkozhatunk "pszeudodimer globin-szerű polipeptidekre" vagy "diglobinokra". Kibővítvé, egy di-alfa, egy di-béta vagy egy alfa/béta globin-szerű polipeptidet tartalmazó hemoglobin-szerű protein egy "pszeudotetramer".

Az egyedüli externális keresztköthető ciszteint hordozó pszeudotetramerekre rövidítésként "mono-cys" molekulákként lehet hivatkozni. Azonban, ezt nem úgy kell értelmezni, hogy a tetramer nem tartalmaz más ciszteineket. Egy "mono-cys" pszeudotetramer csupán olyan tetramer, mely csak egy egyedüli ciszteinnel rendelkezik, mely viszont jelentős fokig vehet részt a keresztkötéses reakcióban egy második pszeudotetramer cisztein maradékával.

Egy hemoglobin-szerű proteint heteromernek neveznek ha legalább két globin-szerű doménje eltérő. Mivel a hagyományos humán hemoglobin két alfa globinből és két béta globinből áll, egy heterotetramer. Egy multimer humán hemoglobin-szerű protein egy olyan heteromer, melyben mindegyik tetramer vagy pszeudotetramer két humán alfa globin-szerű doménnel és két humán béta globin-szerű doménnel rendelkezik.

A globin-szerű domén.

A globin-szerű domének nem szükségszerűen, de lehetnek azonosak polipeptid lánconként, és nem kell hogy pontosan megfeleljenek szekvenciájukban a normál humán hemoglobin alfa és béta globinjainak. Sőt, mutációkat hajthatunk végre a hemoglobin oxigén affinitásának (vagy kooperativitásának, vagy pH, só, hőmérséklet vagy más környezeti paraméterektől való függőségének) megváltoztatására vagy stabilitásának (hőre, savra, lúgra vagy más denaturáló anyagra) megváltoztatására, a genetikai fúzió

vagy keresztkötés elősegítése céljából, vagy az egyedi láncok expressziójának és összeépítésének megkönnyítése céljából. Az itt biztosított bizonyos típusú mutációkhoz az utmutatást, pl. Hoffman and Nagai, (U.S. Patent 5,028,588 és 07/443,950 sorozatszám) leírását az irodalmi hivatkozás révén a találmányba építettük. A találmány továbbá magába foglal olyan molekulákat, melyek önkényes mutációkban térnek el az itt bemutatottaktól, melyek nem befolyásolják lényegesen a biológiai aktivitást.

Egy "globin-szerű domén" egy polipeptid domén, mely alapjában véve homológ a természetesen előforduló hemoglobin egy globin alegységével. Egy "gerinces", "emlős" vagy "humán" globin-szerű domén olyan domén, mely alapjában véve homológ sorrendben egy természetesen előforduló gerinces, emlős vagy humán hemoglobin egy globin alegységével.

Egy humán alfa globin-szerű domén vagy polipeptid egy natív humán alfa globin vagy annak egy olyan mutánsa, mely a natív szekvenciától egy vagy több helyettesítésben, delécióban vagy inzertációban tér el, míg alapjában véve homológ marad (ahogy azt ezek után meghatározzuk) a humán alfa globinnal, valamint továbbra is képes a haem beépítésére és a béta globinnal való összekapcsolódásra. A "humán alfa globin-szerű domén" kifejezés célunk szerint magába foglalja az azokra való korlátozás nélkül a természetesen előforduló humán alfa globinokat, ideértve a normál humán alfa globint. Egy béta globin-szerű domént vagy polipeptidet analóg módon határozzuk meg. Az állati hemoglobinok vagy ezek mutánsainak olyan alegységeit, melyek kellőképpen homológok a humán alfa vagy béta globinnal beleértjük a "humán alfa vagy béta globin-szerű domén vagy polipeptid" fogalmába. Például a szarvasmarha hemoglobin alegységei beletartoznak ezen fogalmak körébe.

Annak meghatározásában, hogy egy polipeptid alapjában véve homológ-e az alfa (vagy béta) globinnal, a szekvencia homológia egy fontos de nem kizárólagos kritérium. A szekvencia hasonlóság meghatározható hagyományos algoritmusokkal, melyek tipikusan megengednek egy kis számú részt a legjobb megfelelés elérése céljából. Egy humán alfa-globin-szerű domén tipikusan legalább 75 %-os szekvencia azonosságot mutat a vad típusu humán alfa globinnal, valamint a humán béta globinnál nagyobb homológiát a humán alfa globinnal. Azonban, egy kisebb szekvencia azonossággal rendelkező polipeptid még mindig tekinthető "alapjában véve homológnak" az alfa globinnal, ha nagyobb szekvencia azonossággal rendelkezik, mint ami a véletlenből várható, valamint ha rendelkezik az alfa globin jellegzetesen magasabb szerkezetével (pl. a "mioglobín hajlással", a haem beépítésének képességével és oxigén-kötő aktivitással. (megjegyzendő, hogy ahogy már említettük, az oxigén affinitásbeli (P50), intravasculáris retencióban, vagy a kooperativitásban bekövetkezett változás kívánatos lehet és nem teszi a mutánst nem homológgá, ha az még mindig hozzájárulhat a reverzibilis oxigén-kötési aktivitáshoz.) Összehasonlításként, az Artemia haem-kötő doménjeit homológoknak tekintjük a mioglobinnal, bár a primer szekvencia hasonlóság 27 %-nál nem nagyobb, ahogy a haem-kötő domének konzervált maradékaik körül és az egyéb hemoglobinokban konzervált maradékok sorbanállnak, (azaz részt vesznek a haem kapcsolatban vagy a helikális szegmentek egymáshoz való viszonyának meghatározásában) azt sugallja, hogy az Artemia domének a klasszikus A-H globin hélixekkel rendelkeznek, megfelelő fordulóikkal, akár csak a különböző konzervált globin család maradékok. A szerin proteáz inhibitorok között, vannak olyan protein családok, melyekről kitudódott, hogy homológok, melyekben vannak olyan párok, melyek 30%-nál kisebb

szekvencia homológiával rendelkeznek.

Több mint 100 humán hemoglobin mutáns ismert érintve mind az alfa és a béta láncokat; és ezen mutációk oxigén-kötésre és a hemoglobin más tulajdonságaira kifejtett hatása ismert. A humán alfa és béta globinok 84 pozícióban térnek el egymástól. Azonkívül, a globin szekvenciában levő tipusközi eltéréseket kimerítően tanulmányozták. Dickerson, (Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology ch. 3 (1983) arról számolt be, hogy 1982-ben a 60 ismert gerinces alfa globin 141 pozíciójából 23 azonos maradékkal rendelkezett, míg a figyelembe vett 66 gerinces béta globin 146 aminosavjából 20 volt azonos. A 60 gerinces mioglobint, melyek szintén a globin családba tartoznak, 27 állandó aminosavat tartalmaznak a 153 pozícióból. Ha csupán az emlősöket vesszük figyelembe, az állandó aminosavak száma az alfa globinok esetében 50/141; a béta globinok esetében 51/146 és a mioglobintok esetében 71/153. Az állandó pozíciók a molekula aktivitási központja köré gyűlnek: a haem részhez és az alegységek közötti kapcsolatokhoz. A változó aminosavak közül a konszenzus szekvenciától a figyelembe vett típusok csupán egy kis frakciója tér el.

A teljes eltérések száma a humán alfa globin és más szelektált gerinces alfa globin között a következő: rhesus majom (4), szarvasmarha (17), kacsacsőrű emlős (39), csirke (35), humán zeta (embrionális) (61), ponty (71) és cápa (88). A gerinctelen globinok esetében az eltérés tengeri orsóhalnál (124) és a Chironomus (muslica) esetében (131). A béta globin családdhoz fordulva a humán béta globin más gerinces béta globinoktól való eltérése rhesus majomnál (8), a humán delta globinnál (10), szarvasmarha béta globinnál (25), szarvasmarha gamma globinnál (33), humán gamma globinnál (39), humán epszilon (embrionális) globinnál (36), kacsacsőrű emlősnél (34), csirkénél (45) cápánál

(96), tengeri orsóhalnál (123), kagylónál (127), Glycera esetében (125) és a Chironomus esetében (128).

Ezek közül az eltérések közül sok félrevezető lehet - a változó aminosavak csak "konzervatív helyettesítést" mutathatnak az egy aminosav másik, funkcionálisan azonosra való cseréjénél. A "konzervatív helyettesítés" egy olyan helyettesítés, mely nem szünteti meg a globin-szerű polipeptid (vagy domén) azon képességét, hogy haemet építsen be és hogy az alfa és béta globin alegységekkel összekapcsolódva egy tetramer (vagy pszeudotetramer hemoglobin-szerű proteint hozzon létre összhangban maradvá annak meghatározásával, valamint reverzibilisen kösse az oxigént. A következő források használhatók a konzervatív helyettesítések (és deléciók vagy inzertációk) azonosítására:

- (a) a funkcionális hemoglobin mutánsok adatai (több mint 100 ilyen mutáns létezik),
- (b) a gerincesek, különösen az emlősök alfa és béta globinjai között előforduló szekvencia variációk adatai;
- (c) a gerincesek, különösen az emlős mioglobinok szekvencia variációinak adatai;
- (d) a gerincesek és a gerinctelenek globinjai, vagy a gerinctelenek globinjai közötti szekvencia variációk adatai;
- (e) a humán hemoglobin és más oxigén-kötő proteinek háromdimenziós szerkezetének adatai, valamint molekuláris modellező software-ek a szekvencia változások ilyen szerkezetekre kifejtett hatásának felbecsüléséhez; és
- (f) a homológ proteinek (nem korlátozódva csupán a globin családra) családjának tagjai közötti aminosav változások gyakoriságának adatai. Lásd Schulz és Schirmer 1-2 Táblázatát (Principles of Protein Structure, Springer-Verlag: 1979) és Creighton 3-9 ábráit (Proteins: Structure and Molecular Properties (W.H. Free-

man: 1983).

Míg az (a) - (d) adatok a leghasználhatóbbak a variációs helyeknél levő tolerálható mutációk meghatározására a rokon proteinekben, hasznos lehet a molekulában más analóg helyeken a tolerálható mutációk azonosításában is. Az (f) kategória adataira alapozva a következő csere csoportok azonosíthatók, melyeken belül az aminosavak helyettesítései gyakran konzervatívak:

I kis alifás, nem poláros vagy enyhén poláros maradékok - Ala, Ser, Thr, (Pro, Gly)

II negatív töltésű maradékok és amidjaik - Asn, Asp, Glu, Gln

III pozitív töltésű maradékok - His, Arg, Lys

IV nagy alifás nem poláros maradékok - Met, Leu, Ile, Val, (Cys)

nagy aromás maradékok - Phe, Tyr, Trp.

Három maradékot beszúrunk, a protein építésben való különleges szerepük miatt. A Gly az egyetlen oldallánc nélküli maradék, ezért rugalmasságot biztosít a láncnak. A Pro szokatlan geometriájú, mely erősen korlátozza a láncot. A Cys részt vehet az olyan diszulfid kötésekben, melyek a proteinek egy sajátos összezsavarodásban tartják. Megjegyzendő, hogy Schulz és Schimer az I és II csoportokat egybeolvasztaná. Az is figyelemreméltó, hogy a Tyr, hidrogénkötő potenciálja miatt valamelyest rokonságban van a Ser-nel, Thr-rel stb.

Általánosságban, a funkcionalitást kevésbé befolyásolják a felszíni maradékokon való mutációk, legalábbis azoknál nem, melyek nem vesznek részt sem a hátsó részben, sem az alegység kapcsolódásokban. Azonkívül az alfa hélixeket összekötő "hurkok",

valamint az amino vagy karboxi terminusok sokkal toleránsabbak a deléciókkal és az inzertációkkal szemben.

A "Met FX alfa globin" egy N-terminális metionint, az Xa Faktorhoz egy felismerő helyként működő oligopeptidet (pl. Ile-Glu-Gly-Arg)(2. számú szekvencia), valamint a vad típusu alfa globinnak vagy ahogy a találmányban leírjuk egy mutánsának megfelelő alfa globin-szerű szekvenciát (pl. Val-His-Leu-Thr-Pro..)(3. számú szekvencia) tartalmazó alfa globin-szerű polipeptid. A "Met Fx alfa globint" néha "FX alfa globin"-ként rövidítjük. Az "FX béta globin" egy analóg módon meghatározott béta globin-szerű polipeptid.

A "Met alfa globin" egy olyan alfa globin-szerű polipeptid, mely egy extra N-terminális metioninnal rendelkezik. A második aminosav valin, mely az érett vad típusu alfa globin első aminosava. A Met-béta globint hasonlóan határozzuk meg. A "Des-FX alfa globin (vagy a "dFX alfa globin") egy olyan Met-alfa globin gén, melyet az FX kódonok Met-FX alfa globin génből való kimetszésével nyertünk. Említésre méltó, hogy a "Met-Hgb" fogalmát a metionil-alfa globinból és a metionil-béta globinból létrehozott metionil Hgb-re való utaláshoz használjuk.

A "Des-Val-alfa globin" (vagy "dVal alfa globin") egy olyan alfa globin-szerű polipeptid, melyben a valint metioninnal helyettesítjük, ami az érett vad típusu alfa globin szekvenciáját kezdi. A Des-Val-béta globint hasonlóképpen definiáljuk. A Des-Val-alfa/alfa globin (di-Des-Val-Alfa globin) egy "di-alfa globin", melyben egy "Des-Val-alfa" szekvenciát kapcsoltunk egy megfelelő peptidil kötőn keresztül egy olyan alfa globin-szerű szekvenciához, mely Val-lal kezdődik.

Kis affinitású mutánsok.

A "kis affinitású hemoglobin-szerű protein" egy olyan hemoglobin-szerű proteire utal, melynek a P_{50} értéke azonos körülmények között legalább 10 %-kal nagyobb, mint a sejtmentes normál hemoglobin A_0 P_{50} értéke. Előnyösen a protein, ha vérpótlószerként használjuk, alacsony affinitású proteinnek minősül, még előnyösebben P_{50} értéke közelebb van a teljes vérsejt P_{50} értékéhez, mint a sejtmentes hemoglobinéhoz.

A kis affinitású mutáns hemoglobinek, azaz azok, melyek "jobbra tolódott" oxigén egyensúlyi kötő görbékkel rendelkeznek a sejtmentes normál hemoglobinhoz viszonyítva, sokféleképpen hasznosíthatók. Leginkább említésre méltók azok a mutáns hemoglobinek, melyek a teljes vörösvérsejtekhez hasonló oxigén affinitással rendelkeznek, ezek oxigén-szállító transzfúziós pótlékként használhatók az adott vörösvérsejtek helyett, csökkentve a fertőzés veszélyét és az ellátási problémákat enyhítve. A sejtmentes nativ humán hemoglobin nem funkcionálhat transzfúziós pótlóként, egyebek között azért, mert az oxigén túl erősen kötődik hozzá. Ezenkívül, azért, mert a sejtmentes hemoglobin oldatok esetében nem szükséges, hogy kereszt illeszkedjenek, valamint elvárás velük szemben, hogy eltartósságuk nagyobb legyen, mint a teljes véré, az alacsony affinitású hemoglobin oldatok széleskörűen használhatók olyan helyzetekben ahol a teljes vér transzfúzió nem valósítható meg, pl. mentőkocsiban vagy a harctereken. A vörösvérsejtekénél is alacsonyabb oxigén affinitású mutáns hemoglobinek valójában még hatékonyabban tudják az oxigént szállítani számos esetben. A teljes vérnél valamivel magasabb (azonban a sejtmentes nativ humán hemoglobinnál alacsonyabb affinitású)

oxigén affinitású mutáns hemoglobinok még mindig megfelelő transzfúziós pótlóként funkcionálhat és valójában bizonyos esetekben sokkal hatékonyabban szállíthatja az oxigént mint a vörösvérsejtek. Ez azért van így, mert az oxigén közvetlenül szabadul fel a plazma formájú hemoglobin-alapu oldatokba, anélkül, hogy szükség lenne a vörösvérsejtek membránján való diffúzióra, valamint a sejtmentes hemoglobin olyan régiókba vándorolhat, ami a vörösvérsejtek számára nem hozzáférhető. Példaként, a kis affinitású mutáns hemoglobintól elvárjuk, hogy koszorúsér levegős érplasztikás eljárás alatt hatékonyan szállítsa az oxigént, mikor a vörösvérsejtek keringését az ilyen eljárások alatt gátoljuk. A kis affinitású mutáns hemoglobin hasznos lehet perfúziós komponensként is a szerv tartósításban a transzplantációt megelőzően vagy emlős sejt tenyészet adalékként.

A lehetséges kis affinitású mutánsokat részletesen megtárgyaljuk a nem korlátozó célú példákon keresztül, valamint Hoffman et al. (US. Patent 5,028,588 számú szabadalom) 1. Táblázatában (természetes kis affinitású hemoglobin mutánsok) és 2. Táblázatában (a nem természetesen előforduló kis affinitású hemoglobin mutánsok lehetséges jelöltjei). Az érdeklődésre különösen számot tartó kis affinitású mutánsok a Presbyterian (béta Lys¹⁰⁸) Béta Phe⁶³, béta Ile⁶⁷ és a Kansas (béta Thr¹⁰²) mutánsok.

A hemoglobin oxigén kötő tulajdonságaiban bekövetkező váratlan és meglepő változást figyeltünk meg, ha az N-terminális valint metioninnal helyettesítettük. A vérből tisztított hemoglobin A₀ P₅₀ értéke 4.03 N=2.8 25 °C hőmérsékleten mérve. Az E. coli-ban termelt DesFX-Hgb az A₀-lal azonos hemoglobin, (azzal az eltéréssel, hogy egy metionint adtunk az alfa és a béta láncok N-terminálisához), alapvetően azonos P₅₀ és N értékekkel rendelkezik. Így a metionin hozzáadása a szomszédos valin maradék

megváltoztatása nélkül kis hatással van, vagy nincs is hatással az oxigén kötésre. Másrészt viszont magasabb P_{50} értéket (6.6) figyeltünk meg az E. coli-ban termelt desVal-hgb, egy olyan hemoglobin esetében, ahol a normális N-terminális valint az egyes láncokon metioninnal helyettesítettük. A kooperativitás, ahogy azt N-nel mértük, gyakorlatilag azonos volt mindhárom molekula esetében.

Hasonló összehasonlítást végeztünk két hemoglobin esetében, melyek mindegyike tartalmazott egy Presbyterian mutációt, az egyiket E. coli-ban, a másikat élesztőgombában termeltük. Az E. coli hemoglobint Des-Val alfa láncsal szerkesztettük meg, azaz az N-terminusnál a normál valint metionin helyettesítette. Az oxigén kötést $P_{50}=19.8$, $N=2.5$ jellemezte 25 °C hőmérsékleten, valamint $P_{50}=34.5$ és $N=2.5$ 27 °C hőmérsékleten. A megfelelő élesztőgomba kódoló régió egy hozzáadott metionin kódonnal kezdődik a normál valin kódon előtt. Mivel ezt a kezdeti metionint eltávolítjuk a transzláció után in vivo, a tisztított hemoglobin egy normál N-terminális valinnal rendelkezik. Ezen molekula esetében, a $P_{50}=23$ - 25 és $N=2.5$ 37 °C hőmérsékleten mérve. Így a fenti esetekben egy N-terminális valin N-terminális metioninra való cseréje megnövelte a P_{50} értéket. Fiziológias körülmények között azt várjuk, hogy az E. coli-ban termelt genetikailag fuzionált Presbyterian hemoglobin 20-30 %-kal több oxigént fog szállítani, mint az élesztőgombában termelt hasonló hemoglobin, megváltoztatott N-terminusával.

Nagy affinitású mutánsok

A "nagy affinitású hemoglobin-szerű protein" fogalma egy olyan hemoglobin-szerű proteinre vonatkozik, melynek P_{50} értéke legalább 10 %-kal kisebb mint a sejtmentes hemoglobin A_0 P_{50} értéke azonos körülmények között.

A nagy affinitású mutáns hemoglobin bizonyos szituációkban felhasználható. Például, perfluorokarbon-alapú vérpótló készítmények vannak klinikai vizsgálatok alatt a szilárd tumorok besugárzásos terápiájának és bizonyos kemoterápiás kezelések fokozására (Dowling, S., Fischer, J.J. and Rockwell, S. (1991) Biomat. Art. Cells Immobil. Biotech., 19 277; Herman, T.S. and Teicher, B.A. (1991) Biomat. Art. Cells and Immobil. Biotech. 19 395; Holden, S.A., Teicher, B.A. and Herman, T.S. (1991) Biomat. Art. Cells and Immobil. Biotech., 19 399). Ezen kutatások alapja az a tény, hogy az oxigén egy szükséges alkotórész a besugárzásos sejt toxicitási folyamatban, valamint bizonyos kemoterápiás reagenseknél. A szilárd tumorok gyakran mutatnak kiemelkedően alacsony parciális oxigén nyomást a tumor belsejében, a terápiát nem elég hatékonynak mutatva. A perfluorokarbon-alapú oxigén hordozó oldatok úgy tűnik drámaian fokoznak bizonyos tumor terápiákat és a hemoglobin-alapú vérpótlóktól azt várjuk, hogy hasonló felhasználásuk lehet. Valószínű, hogy a teljes vörösvérsejttől eltérően a sejtmentes hemoglobin be tud hatolni a tumor belső régióiba hogy oxigént szállítson. A sejtmentes hemoglobin készítmény oxigén felszabadításának aktuális %-a nem egyenes függvénye a P_{50} értéknek sokkal inkább a tüdő parciális oxigén nyomását (ahol az oxigén a hemoglobinnal kapcsolódik) és a szövet parciális nyomását (ahol az oxigén leválik a hemoglobintról) képviselő két nyomás közötti oxigén egyensúlyi kötő görbétől függ. Ezért lehetséges, hogy tumor terápiás hatásjavítóként egy nagy affinitású mutáns hemoglobint részesítsenek előnyben. A nagy

affinitású hemoglobin megtartaná kötött oxigénjét a normál keringési rendszerben, ahol a parciális oxigén nyomása viszonylag magas marad, de felszabadítaná az oxigént a nagyon oxigén-hiányos tumor belsőiben. A normál vagy kis affinitású hemoglobin esetleg kevesebb felszabadítandó, elérhető hemoglobinnal rendelkezik mire eléri a tumor belsejét.

Ismertek a természetesen előforduló nagy affinitású hemoglobin mutánsok is, lásd Bunn és Forget munkáját, a 14-1 Táblázatot és a nem természetesen előforduló nagy affinitású hemoglobin mutánsok jelöltjei az ismert mutánsok és hemoglobin szerkezetek fényében tervezhetők. A különösen előnyben részesített nagy affinitású mutánsokat a 400. Táblázatban mutatjuk be.

Meg kell jegyezni, hogy a genetikai fúzió és a keresztkötés befolyásolhatják az oxigén kötő affinitást.

Cisztein mutációk és diszulfid hid képzés

A cisztein mutációk értéke abban van, hogy fokozzák a tetramer stabilitását (lásd USP 5.028,588 és 07/443,950 sorozatszám). Elősegítik a poli(teramer) ($n \geq 2$) hemoglobinok megszerkesztését. Ez azért van, mert a szomszédos tetramereken levő ciszteinek (ideértve a pszeudotetramereket is) oxidálhatók a diszulfid hidak létrehozása céljából, kovalensen kötve a tetramereket. Továbbá a ciszteinek tiol csoportjai számos keresztkötődő anyaggal reagálathatók.

Számos hely jöhet szóba a ciszteinek hemoglobin-szerű proteinbe való bejuttatásához.

A hely megválasztását megszabó kritériumok a következők: (1)

a mutáció ne befolyásolja a működést; (2) az oldallánc hozzáférhető legyen víz számára oxi vagy dezoxi szerkezetben; (3) a hely az összehajtogatott protein felszínén legyen; (4) az oldallánc szulfhidrilje nyúljon ki a felszínből, és ne a molekula belseje felé orientálódjon; (5) a hely a molekula egy olyan részében legyen, mely közvetlenül nem vesz részt az R→T átvitelben; (6) a változás olyan részben következzen be, melynek nincs erősen rögzített helyzete (az ilyen régiók általában homályos röntgen-diffrakciós mintázatot mutatnak); (7) a mutáció ne tegye tönkre a helyi másodlagos szerkezetet, azaz el kell kerülni a pro → cys mutációkat, melyek a kihajtódási problémákat okozhatják; és (8) ha lehetséges konzervatív változást kell alkalmazni mint amilyen a ser → cys vagy az ala → cys. A mutáció nem szükséges hogy kielégítse a fenti kikötések mindegyikét. Például, felidézhetünk egy olyan helyet, mely részt vesz az R → T átvitelben (lásd az (5) fent), de előnyös változást ad a P₅₀ esetében (lásd (1) fent) az abban való részvétel miatt. A legfontosabb szempont az, hogy a mutáció ne szüntesse meg az O₂ kötést a keresztkötés létrejötte előtt vagy után, és a cisztein elérhető legyen a kívánt keresztkötéses reakcióban való részvételhez.

Az alfa felszínen a lehetséges helyek közé a következők tartoznak: his72, asn78, asn68, ala71, thr67, lys7, thr8, ala12, thr118, lys16, ala45, glu116, gly15, his112, thr24, glu23, lys60, lys56, his50, gly51, glu53, ser49, asp47, gln54, his45, lys90, ala82, lys61, ala19, his20, asp85, ser81, asp75, asp74, lys139, asp64 és gly18 (összesen 40 aminosav).

A béta felszínen a lehetséges helyek közé a következők tartoznak: asp79, his2, leu3, thr4, glu6, ser9, thr12, ala13, gly16, lys17, val118, asn19, val20, asp22, lys65, ser72, ala76, his77, asp79, asn80, gly83, ala86, thr87, glu90, lys95, lys59,

glu43, ser44, asp47, ser49, thr50, ala53, asp52, lys61, glu121, lys120, thr123, lys66, asp73, ala62, his116, his117 (összesen 45 aminosav).

Számos természetesen előforduló mutáns van, melyek már mutációkat mutatnak ezeken a helyeken. Ezek a következő felsorolásban láthatók:

Maradék	Régió	Mutáció
19	AB1	ALA-> GLU
		ALA-> ASP
54	E3	GLN-> ARG
		GLN-> GLU
71	E20	ALA-> GLU
75	EF4	ASP-> GLY
		ASP-> HIS
		ASP-> TYR
		ASP-> ASN
81	F2	SER-> CYS
47	CE5	ASP-> GLY
		ASP-> HIS
		ASP-> ASN

Ha a pszeudo-oktamert hozzuk létre $n=2$) közvetlenül kapcsolva a két pszeudo tetramert egy diszulfid kötésen keresztül a szérumban a felezési idő befolyásolható azzal az aránnyal, melynél az endogén szérum kis molekula tiolok (mint pl. a glutation) csökkentik a diszulfid kötéseket. Ezen reakciók mechanizmusa magába foglalja a tiolát anionokat, mint az aktuálisan redukáló típusokat (Creighton, T.E. (1978) Prog. Biophys. Molec. Biol., 33:259-260; Creighton, T.E. (1975) J. Mol. Biol. 96:767;

Creighton, T.E. (1977) J. Mol. Biol. 113:313). Így a redukció mértéke a molekuláris elektrosztatikus környezet függvénye a diszulfid kötés közelségében. Kisebb arányú redukciót jósolunk ha a diszulfid egy elektrosztatikusan negatív környezetben helyezkedik el, a tiolát anion taszításának köszönhetően. A glutation esetében még a nem reaktív tranziens protonált típus is netto negatív töltéssel rendelkezik és taszító hatás érné, így tovább csökkentve a diszulfid redukció arányát.

A negatív töltésű felületi maradékhöz nagyon közel elhelyezkedő di-alfa vagy di-béta hemoglobin felszíni vagy felszínközeli aminosav maradéka ezért jó választás lehet egy egyedüli cisztein mutáció di-alfa vagy di-béta polipeptidben való lokalizálására. Bár két ilyen cisztein közötti kezdeti diszulfid kötés létrehozása lassabb lehet a két hemoglobin molekulán levő ciszteinekhez közeli negatív töltések közötti taszítás miatt, a reakció elősegíthető erős sók vagy magas pH értékek használatával az in vitro kötés megvalósulásának reakciója során. Ha dezoxi körülmények között hajtjuk végre redox pufferben a reakció elősegíthető a hőmérséklet emelésével.

A negatív töltésű maradékokhoz közeli előnyben részesített helyek a cys mutációkhoz

alfa ser49 közeli asp47; természetesen előforduló ser49 - arg

normális O₂ affinitással

alfa his20 közeli glu23; természetesen előforduló his20 - tyr, gln, arg, nincs ismert nem kívánatos tulajdonsága

alfa lys16 közeli glu116; természetesen előforduló lys - glu normális O₂ affinitással rendelkezik

alfa his50 közeli glu30; természetesen előforduló his50 - asp
nincs ismert nem kívánatos tulajdonsága
béta thr50 közeli asp52; természetesen előforduló thr50 - lys
nincs ismert nem kívánatos tulajdonsága
béta lys65 közeli asp21
béta asn19 közeli asp21

A felszíni vagy a felszínhez közeli cisztein mutációktól általában nem várjuk el, hogy nagyobb hatásuk legyen a hemoglobin pszeudotetramer funkcionalitására. A cisztein mutációktól nem várjuk el, hogy jelentősen destabilizálják az alfa héliceket és a felületi maradékok nem tartoznak bele a hemoglobin oxigén kötő tulajdonságaiba. A legtöbb felszíni maradék átesik jelentős mutáción és nem túl erőltetettek. Meg kell jegyeznünk azt is, hogy a protein légzési mozgás miatt a cisztein oldallánc nem kell hogy szükségszerűen közvetlenül a diszulfid kötés képződéséhez elérhető oldat irányába mutasson.

A pszeudo-oktamer szerkezetben való alkalmazáson túl a felszíni cisztein mutációknak egyéb alkalmazásuk is lehet. Ezek közé a következők tartoznak: (1) multimer hemoglobinok $n > 2$) meg szerkesztése olyan szintetikus szulfhidril reaktív peptidek használatával, melyek kettőnél több reaktív hellyel rendelkeznek; (2) a felszíni cisztein maradékok felhasználhatók a radioizotópokat kötő kelátokhoz kapcsolhatók a feltérképezéshez; és (3) a felszíni ciszteinek felhasználhatók a bio-aktív peptidek vagy más terápiás anyagok kötéséhez keringési felezési idejük növelése céljából vagy szállításuk megcélzásához. Ha a gyógyszer kötődése egy diszulfidon keresztül valósul meg a peptidek hordozójától való felszabadulásának sebessége szabályozható a szomszédos

maradékokkal. A (2) és a (3) alkalmazásához, az egy cisztein/di-alfa vagy di-béta korlátozás szükségtelen.

Kivánatos lehet a normál humán hemoglobin báta 93 helyénél levő cisztein eltávolítása, így az nem vehet részt a polimerizációs reakcióban. Ez a cisztein szerinnel, alaninnal vagy threoninnal helyettesíthető például. Más vad típusu ciszteinek szintén helyettesíthetők, ha erre szükség van, de nem valószínű, hogy ezek részt vesznek a tetramer létrejötte után a keresztkötéses reakcióban.

A haptoglobin kötés csökkentésére irányuló mutációk

Jelenleg úgy vélik, hogy a haptoglobin kötés szerepet játszik a hemoglobin katabolizmusában. Ha ez így van, a hemoglobin intravasculáris retenciója fokozható olyan mutációkkal, melyek gátolják a haptoglobin kötődést. Az oxihemoglobin alfa-béta dimerekre disszociál, melyeket azután a haptoglobin köt meg. Míg a kötési energia többsége a tetramerben eltemetett de a dimerben kitett maradékokhoz való kötődéssel kapcsolatos, úgy tűnik, hogy a tetramer felszínén vannak másodlagos kötési helyek is. Bár a mechanizmus nem világos, a haptoglobin-kötött dimerek a májban levő Kupffer sejtekbe szállítódnak, ahol lebomlanak.

A legkivánatosabb az olyan helyek mutációja lenne, melyek részt vesznek a haptoglobin kötésben és, melyek egy másik tetramer kapcsolódásához is megfelelőek. Az ilyen mutációs helyek a normál humán alfa globin alfa láncában az 1, 6, 74, 82, 85, 89, 90, 93, 118, 120-127 és a 131-146 maradékoknál találhatók. Nem valószínű, hogy a haptoglobin kötés gátolható egy genetikailag

kódolt aminosav csupán egy másik aminosavval való egyedüli helyettesítéses mutációjával. Azonban ha a fenti maradékokat ciszteinnel helyettesítjük, majd a ciszteint keresztkötjük egy másik molekulával, mely jelentősen nagyobb, mint a hagyományos aminosav oldallánc, a szterikus hatás jelentősen fokozódik és a haptoglobin kötés gátolható. Természetesen a polimerizációs szabályozás megőrzéséhez ezeket a mutációkat aszimmetrikusan kell elvégezni a pszeudooligomer polipeptidben, úgy, hogy csak egy keresztkötés legyen tetramerenként.

Ismeretes, hogy még a kovalensen keresztkötődő hemoglobino-
kat is feldolgozhatják a haptoglobinok; erről úgy vélik, hogy a tetramer oxi formájának "légzési" eredménye, acélból, hogy a haptoglobin kellőképpen hozzáférjen a kérdéses alegység interface normálisan eltemetett maradékaihoz. Ez kivédhető a globin egységek szoros keresztkötésével, így a disszociáció nem fog bekövetkezni a kérdéses időszakon belül. A fent megtárgyalt mutációktól eltérően ezeket a mutációkat az összes jelzett alegységnél el kell végezni a maximális hatás eléréséhez.

béta37 ->Cys és alfa92 ->Cys

béta40 ->Cys és alfa92 ->Cys

béta97 ->Cys és alfa41 ->Cys

A fenti mutációk mind az $\alpha_1\beta_2$ és a $\beta_1\alpha_2$ interface-ekben található és úgy zárják be ezeket az interface-eket hogy nem teszik lehetővé a haptoglobin hozzáférését.

A "légzés" alacsony oxigén affinitási mutációkkal is gátolható; a tetramer ekkor több időt tölt a dezoxi állapotban, mely nem érzékeny a haptoglobin támadásával szemben.

A multimer hemoglobin-szerű proteinek előállításában közvetítőként hasznos pszeudomer globin-szerű polipeptidek és pszeudotetramer hemoglobin-szerű proteinek

Kötött formában a hemoglobin könnyen disszociál $\alpha\beta$ dimerekké, melyek kellőképpen kicsik a vese glomerulokon való keresztülhaladáshoz és a Hb ezért gyorsan eltávozik a keringési rendszerből. A hemoglobin oxigén transzport elősegítéséhez szükséges mennyiségénél jóval kisebb mennyiségekben való intravénás adagolása hosszútávú vese károsodást és hiányos működést okozhat. Ackers, G.K. and Halvorson, H.R., proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71:4312-16 (1974); Bunn, H.F. Jandl, J., J. Exp. Med. 129:925-34 (1969). Ha a dimerekké való disszociációt kivédjük, nő az intravasculáris felezési idő és jelentősen csökken a vese toxicitás. Lásd R., Atsumi N., Jackbs, E., Austen W., Vlahakes, G., J. Surg. Res. 47:407-11 (1989). A találmány hemoglobin-szerű proteinjei nem képesek $\alpha\beta$ -dimerekké disszociálni a peptidkötés széttröése nélkül és a hosszabb intravasculáris felezési idő és a csökkent vese toxicitás előnyeivel kell rendelkezzenek.

A dezoxihemoglobin és az oxihemoglobin kristályszerkezetében az egyik α alegység N-terminális Val maradéka és a másik α alegység C-terminális Arg maradéka 2 és 6 Å távolságra vannak és a dezoxihemoglobinban egy sóhidon keresztül kapcsolódnak egymáshoz. Fermi, G., Perutz, M., Shaanan, B., Fourme, R., J. Mol. Biol., 175:159-74 (1984); Shaanan, B., J. Mol. Biol. 171:31-59 (1983). Ez a távolság egy vagy két aminosavval növelhető. Egy extra aminosav adható az α alegység C-terminális Arg maradékához tripszin-katalizált reverz hidrolizissal, az oxigén kötő tulajdonságok szignifikáns megváltoztatása nélkül. Nagai, K., Enoki, Y., Tomita, S. and Teshima, T., J. Biol. Chem., 257:1622-25

(1982). Előnyösen a di-alfa kötő (ha használunk ilyen) 1-3 aminosavból áll, melyek lehetnek azonosak vagy eltérőek. Egy Mono-Gly kötő különösen előnyben részesül. Egy ilyen kötő megtervezésekor fontos felismerni azt, hogy kívánatos egy vagy több olyan aminosavat használni, melyek rugalmasan kapcsolják a két alegységet, egy egyedüli di-alfa globin polipeptid domén né transzformálva ezeket.

A "di-béta" mutánsok előállítását is fontolóra vettük. Az egyik béta alegység N-terminusa és a másik közötti távolság 18.4 Å a dezoxi konfigurációban és 5.2 Å az oxi formában. Előnyösen a di-béta kötő 2-9 aminosavat tartalmaz, melyek lehetnek azonosak vagy eltérőek. A glicin aminosavakat különösen előnyben részesítjük.

Az egyik béta lánc N-terminusa (a β_1 1 Val-nál) és a második béta lánc C terminusa (β_2 146 His) közötti (-gly-) genetikailag fuzionált kötés hossza a di-béta hemoglobinban 1 és megközelítően 9 glicin körüli tartományba eshet. A humán hemoglobin A_0 oxi és a dezoxi kristály szerkezeteiben az ezen terminusok közötti távolság sorrendben 5.22 Å és 17.93 Å (a karboxilát N-terminális nitrogénjétől a C-terminális szénig). Egy egyedüli glicin kötő, mely 4 Å hosszúságnál valamivel kisebb, közel kerülhet az oxi szerkezetben levő két terminus összekapcsolásához, azonban azt várjuk, hogy ez a kötő 14 Å-gel lemarad a dezoxi szerkezetben. Jelentősen több zavar okozható a dezoxi szerkezet vs oxi szerkezetben ezzel a kötővel. Az oxigén kötő tulajdonságokban néhány változás idézhető elő a két terminusban levő pozitív és a negatív töltések deléciójával és ezek amid kötésbe való beépítésével. Továbbá maga a kötő molekula kevésbé destabilizálja az oxi szerkezetet mint a dezoxi szerkezetet, és ez az oxigén affinitásban bekövetkező viszonylag erős növekedéshez vezet.

Hasonlóképpen, a kötőként inzertált két glicin eltérően stabilizálhatja az oxi szerkezetet és ezért a fent leírt mechanizmus-hoz hasonlóan megnövelheti az oxigén affinitást.

Ha a kötő glicinek számát 5-re növeljük a kötő csupán a béta lánc terminusok közötti távolságot kell, hogy áthidalja, és, továbbá inzertálja a hozzáadott szterikus térfogatot a terminusok közé az oxi szerkezetben, így a dezoxi szerkezet viszonylagos stabilizálásához vezet (vagy az oxi destabilizálásához) valamint az ezzel járó oxigén affinitásban bekövetkező csökkenéshez vezethet. A dezoxi szerkezetben a béta terminusok közötti nagy távolságok következtében (az oxi szerkezetben azonban nem) a 6-9 tartományba eső glicin kötők hozzáadása tovább stabilizálhatja az oxi szerkezetet és hasonlóképpen tovább csökkenti az oxigén affinitást.

A globin pszeudodimer harmadik formája alfa és béta globin doméneket is tartalmaz. Az alfa1 béta 2-höz való fúziójának egy lehetséges utja, melynek során a hemoglobint az $\alpha_1\beta_1/\alpha_2\beta_2$ dimer képződéssel szemben stabilizáljuk, az alfa1 C-terminális maradék béta2 C hélix N-terminális maradékához való fúziója, egy új C-terminust hozva létre a béta2 B hélix végén. Az eredeti béta N-terminus, a Val1, az eredeti béta alegység C-terminális maradákhöz fuzionáltatható, a His146-hoz, a protein egy közbeeső új szekciója révén, így létrehoznánk egy olyan folyamatos polipeptid láncot, mely eltérő dimerek alfa és béta alegységeit tartalmaz. Ezt a láncot a következőkkel lehet jellemezni: $\alpha(1-14)-\text{Gly}_3-\beta(35-146)-\text{Gly}_{1-3}-\text{Ala}_{13}-\text{Gly}_{1-3}-\beta(1-34)$; lásd a 6. Ábrát.

A humán dezoxihemoglobin szerkezetének molekuláris grafikai számítógéppel való vizsgálata jelzi a lényeges távolságokat. Az Alfa1 Arg141 karboxil szén és a Béta2 Tyr35 N atomok közötti távolság megközelítően 8.6 Angström. Egy teljesen kinyújtott

lineáris triglicin peptidet megközelítően 10.1 Angström hosszúságúnak mértünk a N terminális maradéktól a C terminális maradékig. Ez azt sugallja, hogy három glicin maradék használható az Arg141 és Tyr35 maradékok közötti távolság áthidalására minimálisan kedvezőtlen szterikus kölcsönhatásokkal és maximális konformációs szabadsággal. A távolságbeli elvárások eltérőek lehetnek az oxihemoglobin esetében, és ha ez így van a fúziós peptid szekvenciája megváltoztatható a két szerkezet igényeinek legjobb kielégítése céljából.

A humán dezoxihemoglobinban a Béta2 His146 karboxil szén és a béta2 Val1 nitrogén atomok közötti távolság megközelítően 25 Angström. A 13 Alanin maradék lineáris szekvenciájából megszerkesztett jobbra csavarodó 3.6 Alfa hélix esetében azt találtuk, hogy az N és a C terminális közötti távolság 22 Angström. Az ezen hélix mindegyik végéhez való egy - három glicin maradék hozzáadásával (a $\text{Gly}_n(\text{Ala})_{13}\text{Gly}_n$, ahol $n=1 - 3$) az igényelt távolság áthidalható és elegendő konformációs rugalmasság biztosítható a komoly terciér tömörülési problémák elkerülése céljából. Továbbá a hélix aminosav szekvenciája megváltoztatható a kedvező hidrogén kötések és sókötések létrehozása céljából az új hélix és a Béta2 hélix között, mely ellen ez az összehajtott proteinbe tömörülne. Az ilyen interakciók segíthetik a manipulált protein stabilizálását.

A kötések között a Glicin az előnyben részesített aminosav, mivel erről ismert, hogy meglehetősen rugalmas, Cantor és Schimmel, Biophysical Chemistry part 1, pp.266-9 (1980), és lehetővé teszi annak a láncnak a sokkal tömöttebb szerkezetet, melybe beépült. Azonban a kötött tartalmazó maradékok nem korlátozódnak a glicinekre; más maradékok is ide tartozhatnak a glicin helyett vagy azon túl, mint pl. az alanin vagy a threonin. Mivel ezeknek

az aminosavaknak sokkal korlátozottabb konformációs helyük van a proteinben, ezek valószínűleg sokkal merevebb kötő láncokat eredményeznek és sokkal hangsúlyosabb hatásuk van az oxi/dezoxi szerkezetek relatív stabilizációjára/destabilizációjára.

Meg kell érteni, hogy az aminosavak minimális és maximális száma a kötőben az áthidalandó távolság függvénye az oxi és a dezoxi formákban is, függ a választott aminosavtól és az adott aminosav szekvencia másodlagos szerkezetet képező hajlandós-ágától. Ugyan a random orsót részesítjük gyakran előnyben, nem szükséges, és a másodlagos szerkezetben levő nagy számú aminosavat tartalmazó kötő azonos áthidalóval rendelkezhet mint a kevesebb aminosavból álló random orsós kötő. Egy kötő tartalmazhat pl. 1-3 glicint, melyet egy másodlagos szerkezetű szekvencia követ, melyet 1-3 több glicin követ ismét. A maradékonkénti transzláció a poliprolin I esetében 1.9 Å, a poliprolin II esetében 3.12, a poliglicin II esetében 3.1, az antiparalell β -lemez esetében 3.4, a paralell β -lemez esetében 3.2, 1.5 a jobbra csavarodó α -hélix esetében, 2.0 a 3_{10} hélix esetében és a π hélix esetében 1.15. A teljesen kinyújtott láncban a maradékonkénti maximális transzláció 3.63 Å ha az ismétlődő egységek lépcsősen oszlanak el és 3.8 Å ha a peptid kötés transz.

A kötőben levő aminosavak száma olyan lehet, hogy a másodlagos szerkezet létrejötte, mint az alfa-hélix vagy a béta-lemez, nem kívánatos, mivel a rés csökkentett. Bizonyos aminosavak nagyobb tendenciát mutatnak az ilyen szerkezetekben való részvételre. Lásd Chou és Fasman Biochemistry, 13:222-245 (1974), mely a hivatkozás révén része a találmánynak. Az alábbiakban az aminosavakat a csökkenő részvétel sorrendjében adtuk meg. Az előnyben részesített kötő aminosavat nagybetűvel szedtük. Erre a célra a legalkalmasabb aminosav a glicin. A leginkább előnyben

részesített di-alfa kötők a Gly vagy a Gly-Gly.

Alfa Hélix képzők Béta-Lemez képzők

Glu (1.53)	Met (1.67)
Ala (1.45)	Val (1.65)
<u>Leu (1.34) Hα</u>	<u>Ile (1.60) Hβ</u>
His (1.24)	Cys (1.30)
Met (1.20)	Tyr (1.29)
Gln (1.17)	Phe (1.28)
Val (1.14)	Gln (1.23)
Trp (1.14)	Leu (1.22)
<u>Phe (1.12) hα</u>	Thr (1.20)
<u>LYS (1.07)</u>	<u>Trp (1.19) hβ</u>
Ile (1.00)	<u>Ala (0.97) Iβ</u>
<u>ASP (0.98)</u>	<u>ARG (0.90)</u>
Thr (0.82)	<u>GLY (0.81)</u>
<u>ARG (0.79)</u>	<u>ASP (0.80) iβ</u>
<u>SER (0.79)</u>	LYS (0.74)
<u>Cys (0.77) iα</u>	<u>SER (0.72)</u>
<u>ASN (0.73)</u>	His (0.71)
<u>Tyr (0.61) bα</u>	<u>ASN (0.65)</u>
<u>PRO (0.59)</u>	<u>PRO (0.62) bβ</u>
<u>GLY (0.53) Bα</u>	Glu (0.26) B β

(A betűszimbólumok: H α erős α képzők; h α α képzők; I α gyenge α képzők; i α α indifferens; b α α törő; és B α erős α törő. A β szimbólumok analógok. Trp b β ha a β -lemez régió C-terminálisához közel van.)

A polipeptid lánc alfa hélice átlagosan 3.6 maradékot tartalmaz fordulóként. A globurális proteinekben az átlagos hosszúság kb. 17 Å, ami 11 maradéknak vagy 3 hélix fordulónak felel

meg. Az alfa és a béta globinban a hélixek hosszúsága 7 - 21 aminosav közé esik (A.A.). A béta elrendezésű lemez 2.3 maradékot tartalmaz fordulóként; az átlagos hossz kb. 20 Å vagy 6 maradék.

Chou és Fasman egy alfa hélix magot a következőképpen határoznak meg: négy hélix képző maradékot és egynél nem több hélix törőt tartalmazó hexapeptid és a béta lemez nukleuszt: három béta lemez képző maradékot és egynél nem több béta lemez törőt tartalmazó pentapeptid.

A di-alfa kötő közelében levő aminosav szekvencia a következő:

maradék #	138	139	140	141		1	2	3	4
AA	Ser	Lys	Tyr	Arg - (XXX) _n		Val	Leu	Ser	Pro
(4. számu szekvencia)						(5. számu szekvencia)			
Helix Not	H21	HC1	HC2	HC3		NA1	NA2	A1	A2
Helix Pot	079	107	061	079		114	134	079	059
Lemez Pot	072	074	129	090		165	122	072	062

(Megjegyzés: A hélix és lemez képző potenciálokat 100-zal szoroztuk tipográfiai okokból.)

A di-alfa kötő előnyösen csupán 1-3 aminosav. Így az alfa-hélixet csupán a kötő "terminusokkal" együtt képesek létrehozni. Az egy vagy két maradékos kötő, még ha erős másodlagos szerkezet hajlammal rendelkező aminosavakat is tartalmaz nem valószínű, hogy felveszi az alfa hélix vagy a béta lemez konfigurációt az Arg 141 vagy a Ser 3 törő hatását figyelembe véve. Ha a kötő 3 maradék hosszú, kívánatos lenne, ha egynél nem több maradék lenne erős alfa hélix képző, hacsak a kötő nem tartalmaz egy erős alfa

hélix törőt is.

A di-béta kötő közelében levő aminosav szekvencia még szigorúbb kényszert mutat:

143	144	145	146		1	2	3	4
His	Lys	Tyr	His - (XXX) _n -	Val	His	Leu	Thr	
(6. számú szekvencia)				(7. számú szekvencia)				
H21	HC1	HC2	HC3	NA1	NA2	NA3	A1	
124	107	061	124	114	124	134	082	
071	074	129	071	165	071	122	120	

A di-béta kötő valószínűleg hosszabb (előnyösen 1-9 A.A.) és ezért sokkal érzékenyebb a másodlagos szerkezet képződéssel szemben. Ha a másodlagos szerkezet létrejötte nem kívánatos, kívánatos, hogy a Val-1-gyel szomszédos aminosav egy alfa hélix törő legyen (pl. Glicin) a Val-His-Leu Alfa hélix hajlamát figyelembe véve. Még általánosabban, kívánatos, hogy a kötő ne tartalmazzon (vagy kooperáljon a legközelebb kötött aminosavakkal hogy létrehozzon) egy alfa hélix nukleuszt vagy béta lemez nukleuszt.

Ha a másodlagos szerkezet nem kívánatos, az alfa hélix képződésre nagy hajlandóságot mutató aminosavakat lehet felhasználni a kötőben, ha "hélix törő" aminosavak követik ezeket. Hasonlóképpen a béta lemez képződés kivédhető a "lemez törő" aminosavakkal.

Természetesen, egy másodlagos szerkezet Chou és Fasman-féle megközelítést felhasználó megjósolásának megvannak a maga korlátai és egy kötő elfogadhatóságának végső tesztelése az, hogy a di-alfa vagy a di-béta hemoglobinnak egyaránt megvan a kívánt

oxigénnel szembeni affinitása. Közelebbről, egy poli-alanin kötő, feltételezett alfa hélix képződésre való hajlandósága ellenére, hasznos lehet, mivel az alanin csoport szilárd, ezért a kötő meglehetősen rugalmas ha a másodlagos szerkezet nem jön létre.

Egy különösen előnyben részesített megvalósulásban a di-alfa és béta globin géneket egy egyedüli policisztronos operonban egyesítjük. A policisztronos operon alkalmazása azonban nem szükséges a találmány alkalmazásához és az alfa (vagy di-alfa) és béta (vagy di-béta) globin gének különálló promóterekből is expresszálhatók, melyek lehetnek azonosak vagy eltérőek.

Míg a találmány előnyben részesített "genetikailag fúzionált hemoglobinja" egy di-alfa és/vagy di-béta globint tartalmaz, más globin láncok genetikailag fúzionáltathatók és felhasználhatók a Hgb A1 ($\alpha_2\beta_2$) típusú hemoglobintól eltérő hemoglobin multimerek termelésére.

Diszulfid hidakkal rendelkező pszeudo oktamer (ditetramer) hemoglobin-szerű proteinek

Egy egyedüli dialfa polipeptidet és két béta láncot (vagy egy dibéta polipeptidet és két alfa láncot) tartalmazó pszeudotetramer rekombináns hemoglobinok létrehozásának képessége egyedülálló lehetőséget biztosít egy normálisan szimmetrikus pszeudotetramerből való aszimmetrikus pszeudotetramer létrehozására. Mivel a két alfa globin domén egyedüli polipeptidként expresszálódik lehetséges az egyik alfa globin domén megváltoztatása a másik megváltoztatása nélkül. Az eredmény egy olyan protein, mely a végső hajtogatott állapotában két eltérő alfa

globin domént tartalmaz szigorú 1:1 arányban. Ezzel az egyedülálló kémiai tulajdonsággal rendelkező aszimmetrikus hemoglobin molekula nem állítható elő könnyen más módszerekkel. A találmány egy előnyben részesített megvalósulása magába foglalná egy di-alfa hemoglobint, mint pl. az SGE1.1 (egy béta lánc Presbyterian mutációval rendelkező di-alfa hemoglobint) két alfa globin doménjének egyikében egy cisztein maradék helyettesítését célzó hely-irányította mutagenézis alkalmazását oly módon, hogy a cisztein a hajtott rekombináns hemoglobin molekula felszínén lenne. Ezután a pszeudooktamer hemoglobin egy homogén készítményét hozhatnánk létre két pszeudotetramer interhemoglobin kötésén keresztül vagy a tisztított pszeudotetramerek egyszerű oxidációjával közvetlenül, vagy egy hidat létrehozó molekulával való reakcióval (3. Ábra).

Bár a kémiai keresztkötés szükségességének elkerüléséhez kívánatos a két "mono cys" tetramer közötti diszulfid kötés közvetlen létrejötte, természetesen előforduló redukáló anyagok jelentős mértékben redukálhatják a diszulfid kötést *in vivo*. Előzetes vizsgálatok azt jelzik, hogy a kötés redukciójának sebességét a hemoglobin felszínén levő cisztein mutációjának elhelyezkedése is befolyásolhatja.

A felületi cisztein mutánsok (MW = 64 kDa) a diszulfid kötő dimerhez oxidálhatók oxidatív körülmények között. Ez úgy valósítható meg, hogy az expresszált protein koncentrált oldatát keverjük pH 8 értéken tiszta oxigén alatt 4 °C hőmérsékleten vagy szobahőmérsékleten sötétben. Átmeneti fémionok mint pl. Cu^{2+} nyomnyi mennyiségei adhatók 1 μM szint alatt az oxidáció katalizálása céljából (1). A 128 kDa hosszúságú oktamer képződését gélszűrővel észlelhetjük. Az oldat oxigénnek való telítése emelt pH értéken minimalizálja a rekombináns hemoglobin autooxidá-

cióját.

Egy alternatív eljárás, mely ezen reakció katalizálásának előnyben részesített módszere, magába foglalja redox pufferek, mint pl a redukált vagy oxidált glutation vagy redukált vagy oxidált ditiotreitol használatát (2). A diszulfid átalakuláson keresztüli reakció katalizise szükséges lehet a nyom átmeneti fém katalizis szabályozásához (3). És másodszor, hasonló megközelítés magába foglalja a 65 kDa tipusban a felszíni ciszteinek szulfonátokká való átalakítását a tisztítás előtt (a 128 kDa típusok tisztítás alatti képződésének elkerülése céljából), melyet a redukált glutationnal való diszulfid-kötött 128 kDa tipussá való konverzió követ (2).

(1) Freedman, R.B. and Hillson, D.A. (1980) "Formation of Disulfide Bonds" In: The Enzymology of Post Translational Modification of Proteins, Vol. 1, p. 157 ff (Academic Press).

(2) DiMarchi, R. et al., (1988) Chemical synthesis of human epidermal growth factor (EGF) and human type a transforming growth factor (TGFA) In: Peptides: Chemistry and Biology (G.R. Marshall, ed.) pp. 202-203 (Leiden:ESCOM).

(3) Creighton, T.E. (1978) Experimental studies of protein folding and unfolding. Prog. Biophys. Molec. Biol. 33:231-297.

Más intercisztein kötésekkel rendelkező multimer hemoglobin-szerű proteinek

Természetesen lehetséges két mono cys molekula homobifunkcionális keresztkötő reagensekkel való párosítása is, mely a nem redukálható kötésekén keresztül valósul meg. A polimerizáció foka

most is szabályozható a mono cys di-alfa vagy di-béta Hgb kiindulási anyag használatával.

A bi-, tri-, tetra-, hexa-, vagy okta-funkcionális keresztkötők használatával a multimer hemoglobin számos tulajdonsága, mely hozzájárulhat a hosszabb szérumszféra felezési időhöz, szabályozható. A keresztkötők tervezhetők úgy, hogy nemredukálható kötést adjanak két teramer között, $n > 2$ pszeudo-tetramerek (pl. dodekamerek, stb.) nagy molekulásúlyú multimerjeinek létrehozása céljából és/vagy a hemoglobin oktamer teljes izoelektromos pontjának csökkentése céljából felezési idejének további növelése végett.

A molekula súly szérumszféra felezési idő korrelációja az olyan proteinek esetében mint az IL-2, azt mutatja, hogy egy jelentősen hosszabb felezési idő várható ha egy protein molekulásúlya megnő, különösen az 50-70 kDa-os vese-szűrési határon felül. Azonban a tetramerek között egy diszulfid kötéssel létrejött multimer hemoglobin felezési idejét potenciálisan korlátozó faktor a szérumban talált endogén tiol-redukáló anyagok által előidézett cys-cys diszulfid kötés redukciója. A plazmában levő kis molekulájú tiol szintek becsült értékei $17 \mu\text{M}$ - $5 \mu\text{M}$ között változnak. A fő típus a redukált glutation. A plazmában levő más tiol vegyületek a következőket foglalják magukba: cisztein, homocisztein és gamma-glutamil cisztein. Így a kis molekulás plazma tiolok érhetőek el a diszulfid kötések redukálásához. Ezt tükrözik a hagyományos diszulfidokkal kötött antitest - ricin A lánc konjugátumok esetében megfigyelt csökkent felezési idők (6.7 óra) a szterikusan megakadályozott és így kevésbé redukálható alfa-metil diszulfidokkal kötött konjugátumokéhoz viszonyítva (42.5 óra).

Így, egy megvalósulásban, az oktamer hemoglobin egy nem

redukálható kén-tartalmú keresztkötést mutat, mint pl. egy tioéter kötést vagy egy tiol-maleimid terméket. Ezek jelentősen megnövelhetik a multimer felezési időt. Egyszerű homobifunkcionális keresztkötők vagy polietilén glikol (peg) származékok hasonlóképpen hasznosak lehetnek ebből a célból (lásd lent). Egy bifunkcionális cisztein-specifikus keresztkötő mono-cys di-alfa vagy di-béta Hgb-vel való reakciója egy szulzó alakú oktamer hemoglobinra és nem reagált hemoglobinra korlátozná a reakció termékeit. A reakció stoichiometrikus kell legyen, ha a Hgb és a keresztkötő nagy koncentrációban van jelen és ha a Hgb egy kis többletben van a keresztkötő maleimidekhez képest 6.5-7.0 pH értéken. Továbbá, nem szabad, hogy jelentős kölcsönhatás legyen a globin lizinekkal való reakciója révén. A tiolok lizinnel szembeni kedvező reaktivitása durván kiszámítható, moláris arányuk és a maleimid - tiolok vs aminok valódi reaktivitása arányának szorzataként. Ez a szorzat kb $[1 \text{ cys}/40 \text{ lys}] \times [1000] = 25$ pH7 értéken. A melléktermékek még mindig oktamerek lesznek, és mivel az egyik kapcsolódási hely egy másodlagos amin így funkcionálisan megfelelnek az S-keresztkötött oktamereknek. A maleimid melléktermék hidrolizise pH7 esetében lassu és a gyűrű felnyílás a keresztkötést érintetlenül hagyja.

A tioéter $\text{RC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ szulfhidril-hordozó proteinnel ($\text{R}'\text{SH}$) való reakciója a következő keresztkötést eredményezi: $\text{RC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{-S-R}'$. A maleimid proteinnel való reakciója az öttagú maleimid gyűrű kettős kötésén keresztül $\text{R}'\text{SH}$ hozzáadását eredményezi, így egy tiomaleimid melléktermék jön létre.

A következőkben az olyan homobifunkcionális keresztkötőkre adunk példákat, melyek metabolikusan stabil keresztkötéseket hoznak létre a monocisztein pszeudo tetramerek között:

- 1) 1,2-bis-(2-jódetoxi)etán

- 2) 4,4'-dimaleiimidilbenzén vagy N,N'-p-feniléndimaleiimid
 3) N,N'-bis-(3-maleiimido-propipnil)-2-hidroxi-1,3-propán diamin.

Hosszabb felezési idők érhetők el, ha a jelen oldat molekulasúlyát megnöveljük, egyszerűen a két kötött tetramer közötti távolság megnövelésével egy hosszú keresztkötő anyagot használva. Néhány potenciálisan új polietilén glikol származék - SGE1.1 monocys-szel reagáló - homobifunkcionális keresztkötőként való használata egy az oktamer hemoglobin molekulasúlyának jelentős növelésére szolgáló mechanizmust biztosít csupán a keresztkötő hosszán keresztül.

Erre a célra alkalmas keresztkötő a maleiimido-CH₂CH₂(=O)(OCH₂CH₂)_nOC(=O)CH₂CH₂-maleiimido. A hosszúság az *n* variálásával igazítható. Az alábbiakban néhány példát mutatunk be.

Szerkezet	Maximális hossz	Forrás
<i>n</i> = 22	- 49 Å	peg -1000
<i>n</i> = 76	- 166 Å	peg -3350
<i>n</i> = 227	- 499 Å	peg -10000

Homobifunkcionális N-hidroxiszukcinimid-aktivált peg-et használtunk korábban a hemoglobin származtatására. Yabuki et al., Transfusion, 30:516 (1990). Ez a reakció monomer, dimer és trimer típusok polidiszperz keverékét eredményezi, a peg/hemoglobin átlagos stiochiomertíája 6.2. Azonban a peg-gel származtatott hemoglobin 83 %-a nem keresztkötődött más hemoglobin molekulával. A vad típusú hemoglobin peg-gel való származtatása nem szabályozható, mivel a hemoglobin kiindulási anyag esetében nincs hely-irányította jelölés.

Ezzel szemben, az SGE 1.1 mono-cys kiindulási anyagának és egy peg keresztkötőnek a vegyítése alapján véve egy monodiszperz szulyzó alakú (pszeudo-oktamer) terméket eredményez. A keresztkötő kapcsolódási helyének hely-irányítása az adott molekulaszulyzó pontos szabályozását eredményezi, mely a keresztkötő méretétől függ. Továbbá, a rekombináns hemoglobin felszínén levő cys-mutáció helyének gondos szabályozása biztosítja, hogy a származtatott hemoglobin funkcionalitása megmaradjon.

Magasabb multimer hemoglobinok

A fenti keresztkötések mind magukba foglalják egy tetramer a keresztkötő mindegyik végéhez való kapcsolását. Előnyös lehet kettőnél több tetramer kapcsolása egy egyedüli keresztkötőhöz a nagyobb oxigén-hordozó kapacitás elérése céljából, valamint a molekulaszulyzó további növelése céljából.

Egy multimer hemoglobin összeállítható egy vagy több kötő peptid segítségével, melyek mindegyike szabályozott számú reaktív hellyel rendelkezik, melyekhez a hemoglobin tetramer vagy a pszeudotetramer cisztein maradéka közvetlenül vagy közvetve kapcsolható.

Egy megfelelő hosszúságú peptid kötővel kapcsolatban az az aggodalom, hogy a szérum proteáz le fogja bontani, így a multimer hemoglobint lebontja alkotó tetramerjeire. Ez a probléma, ha jelentős, egy olyan peptid kötő használatával orvosolható, mely kevésbé érzékeny a proteolizissal szemben. Az ilyen kötőket tartalmazó nem kimerítő lista D-aminosavakból álló peptideket

foglal magába, olyan peptideket, melyek stabil, nyújtott másodlagos szerkezetűek és elágazó peptidek.

A D-aminosavakból álló peptidek esetében D-Glu vagy D-Asp használata különösen előnyben részesített.

Számos stabil, kinyújtott, másodlagos szerkezet ismert. A legegyszerűbb feltételezhetően a poliprolin. Másik példa a kétszálú csavart orsó, melyben két peptid lánc fonódik egybe. Egy 4-helikális vagy egy 4-szálú csavart orsó szintén lehetséges.

Elágazó szerkezetek, mint amelyeneket a lizin másodlagos amino csoportjának származtatásával nyerünk tipikusan ellenállnak a proteázzal szemben.

Ha kívánatos, ezen megközelítések vegyíthetők. Például, számos csavart orsó kezdhet egy elágazó szerkezetet, vagy D-aminosavak építhetők be egy csavart orsóba.

Egy hipotetikus 4-tetramer csavart orsós kötő komplexet mutat be a 4(a) ábra. Ezen csavart orsójú peptidek tervezését és szintézisét már megvizsgálták (példának lásd Cohen and Perry, Proteins, 7:1-15 (1990)). A csavart orsó magyarázata az, hogy két egymásba fonódó alfa hélix kevésbé lesz érzékeny a proteolitikus hasítással szemben mint egy egyedüli csupasz másodlagos szerkezet, mint egy kinyújtott peptid (a proteázok gyorsan hasítják), egy alfa hélix vagy egy béta lemez.

Molekuláris modellezést használva, egy belső diszulfid tervezhető a bi-funkcionális csavart orsó kötő centrumába oly módon, hogy a szálak kovalensen kapcsolódnak. Ez stabilizálná a helyes csavart orsójú keresztkötő képződését mielőtt mono-cys di-alfa vagy di-béta Hgb (pl. sge1.1 cys) kapcsolódna. Továbbá, egy tri-funkcionális keresztkötő sokkal inkább stabilizálható egy ortogonálisan védett lizin (lys-FMOC) használatával mint egy proteolitikusan inert másodlagos szerkezet központjában levő

diszulfid. Egy poliprolin hélix használható kötőként és stabilizálható a szintézis lys-FMOC-nál való elágaztatásával az oldalláncok eltávolítása után. Az elágazó peptidben a megmaradó három lizin ezután jódacetilálható, hogy hely-specifikusan kapcsoljon egy tiol-reaktív csoportot jódecet anhidridet vagy N-szukcinimidiljód-acetátot használva, majd sgel.1-cys-szel reagáltatva. Egy analóg tetra-funkcionális keresztkötő szintetizálható két belső elágazó lizin közé való 1-2 prolin insertálásával ezek oly módon való rotáltatása céljából, hogy az ortogonálisan védett lizinekből kinövő két belső elágazó lánc (majdnem) ellenkező irányban álljon. Analóg szerkezetek hozhatók létre D-glutamát (E) vagy D-aszpartát (D) használatával a proteázzal szembeni rezisztencia biztosításához és ezek egy kinyújtott polianionos láncot hoznának létre pH=7 értéken.

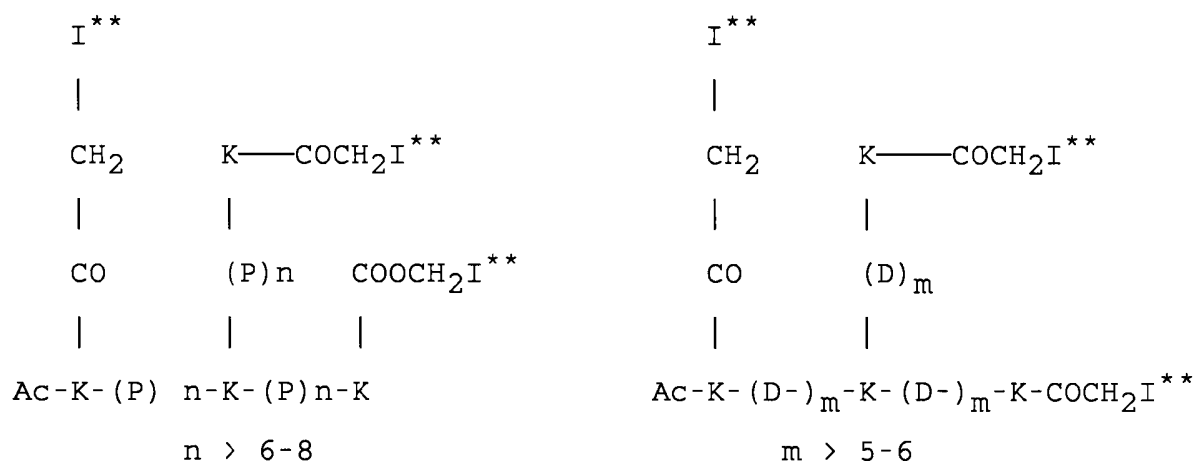
Az alfa-helikális csavart orsó hipotetikus szekvenciáját a Semchuck et al által megadott szekvenciából (Peptides: Chemistry, Structure and Biology; 566 (Rivier and Marschall eds:1990)) módosítottuk abból a célból, hogy csupán két lizint hagyjunk (K) az egyes végeken:

AcKCAELEGRLALEGRLEALEGRLEALEGRLEALEGKL-amid (8. számú szekvencia)

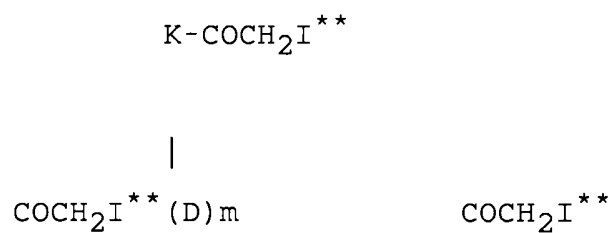
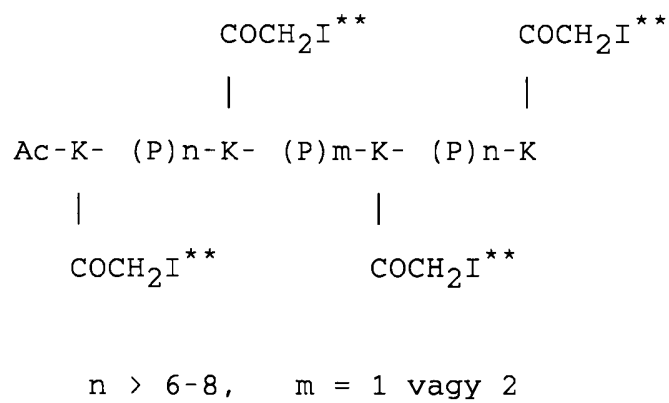
Ez a csavart orsó egy hélix kb. 10 fordulójával rendelkezik és így kb. 54 Å hosszú, lehetővé teszi, hogy két tetramer kapcsolódjon az egyes oldalakon szterikus kölcsönhatások nélkül. A négy tetramer megfelelő elhelyezkedését lehetővé tevő pontos szekvencia és hosszúság a molekuláris modellezés eredményeitől függ.

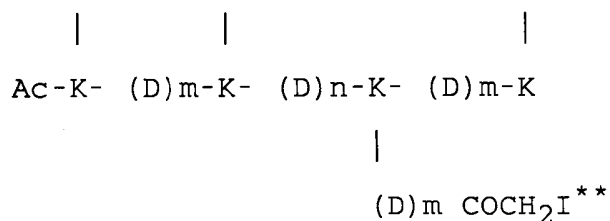
Az alábbiakban ajánlott trifunkcionális és tetrafunkcionális keresztkötőket mutatunk be.

TRIFUNKCIONÁLIS



TETRAFUNKCIONÁLIS





$$m > 5-6, \quad n = 1 \text{ vagy } 2$$

(D egy D-aminosav lehet a nagyobb proteáz rezisztenciához)

(** egy reaktív helyet jelöl; K egy lizin; P Prolin, Ac acetyl; I jódd; D D vagy L-aszpartát; a K-k az ellenkező oldalon vannak így a pszeidotetramerek a csavart orsó ellentétes oldalán kapcsolódnak)

Lásd a 4(a) ábrát is.

Másik lehetőség egy 8-hemoglobinú komplex (4(b) ábra). Az ilyen típusú komplex figyelembe vételének egyszerű magyarázata az, hogy ez a nagyon hosszú felezési idő elérésének egy útja lehet, a "keresztköti" különösen erős stabilitásának, valamint a komplex jelentősen nagyobb molekulásúlyának köszönhetően. A keresztköti felveheti egy kettős elágazású csavart orsó alakját, a lánc közepén levő Arg elágazást lehetővé tevő Lys(FMOC)-kal való helyettesítésével, és egy poliprolin hélixszel vagy más az elágazó egységet tartalmazó proteáz rezisztens másodlagos szerkezettel. Ez a szerkezet lehetővé teheti 6 SGE1.1 kapcsolódását keresztkötiént. Másik lehetőségként a köti megfelelő magjaként egy 4-helikális csomóval rendelkező protein (lásd a 4(c) ábrát) vagy egy 4-szálú csavart orsó, mint amelyet DeGrado (Science, 243:622 (1989)) szintetizált használható, az egyes hélixek a 4 helikális csomóban a GELEELLKKLKELLKG (9. számú szekvencia) konszenzus szekvenciát tartalmazzák, a hélixek három PRR vagy

PRP hurkokon keresztül kötődnek. Ez egyike a legstabilabb ismert proteineknek, a hajtogatott formát a nem hajtogatott formától $G = -22$ kcal/mol-lal szeparálja. Az egyes hélixek 4+ fordulóval rendelkeznek vagy kb. 22 Å hosszúak. Mivel ez nem jelent elegendő helyet két hemoglobinnak a hélix egyes végeihez való rögzítéséhez, ezek ugyanezen hélix eltérő felületére kell hogy kapcsolódjanak, lizinekhez, melyek az egyes hélixek poláros felszínének végeinél helyezkednek el. Az egyes hélixek amphipatikusak; ez viszonylag nagy szabadságot ad ahhoz, hogy összesen 8 lizin legyen jelen (és nem több), valamint hogy a fennmaradó lizineket argininekre cseréljük. A hélixenkénti $i, i+4$ sóhidak közül legalább kettőt meg kell tartani a protein stabilitásához. Egy külső kereszt-kötődő cisztein-hordozó tetramer kapcsolása a lizin epszilon amino csoportok jódacetilálásán keresztül valósítható meg, majd a cisztein tiol csoportjával való reakcióval.

Egy módosítást bemutató példa, mely több helyet enged a tetramerek között a hélix egy fordulójának hozzáadása az A és a C hélixek N-terminusához és a B és D hélixek C-terminusához. Ez és hasonló módosítások a modellezés és kísérleti kényszer tárgyát képezik.

Analóg mag proteinek hozhatók létre az ismert 4-helikális csómóval rendelkező proteinek mutánsaiként, mint pl. a miohemeritritin vagy az apoferritin, a felületi maradékokat úgy változtattuk meg, hogy 8 (vagy ha topológiailag lehetséges több) lizin (hélixenként kettő) van jelen a felületen az egymást követő módosításhoz és a tetramer kapcsolásához.

Csökkentett izoelektromos pontokkal rendelkező poli(tetramer) hemoglobinok

Ha a teljes keresztkötött konjugátum izoelektromos pontja befolyással van a szérum felezési idejére a vese szűrő "pórusok"-tól való elektrosztatikus exklúzió keresztül további negatív töltések vonhatók be a keresztkötésbe (a hemoglobin helyett, mely a molekula funkcióját változtatná meg) a teljes keresztkötött részecske izoelektromos pontjának csökkentése céljából. Ennek egy további előnye a retikuloendoteliális rendszer általi csökkentett felvétel, ez a felvétel a kationozált albuminhoz a pI funkciója.

Az SGE1.1 szukcinilációjából előzetes bizonyítékunk van, mely szerint összefüggés van a módosított lizinek száma és az izoelektromos pont között. Ez durva becslést ad a lys glu-vá és/vagy a lys asp-pá való mutációinak számáról, mely ahhoz szükséges, hogy a pI 5 vagy kevesebb legyen. Ez az a pI tartomány, mely véleményünk szerint a felezési idő jelentős megnöveléséhez szükséges. Ugy véljük, hogy mintegy 8 lizin módosítására lehet szükség (16 egység töltésében a teljes változtatás) a kb. 2 egységnyi pI csökkentéshez. A hemoglobin funkcionális tulajdonságait tekintve kevésbé romboló ha ezt az alfa vagy a béta globin alegységek mutációja helyett inkább a peptid keresztkötőkön keresztül valósítjuk meg. Azonban néhány mutáció elvégezhető a keresztkötőben is és a fennmaradó alegységekben is. Ahogy korábban, az SGE1.1 a jódacetilált lizin epszi- lon amino csoportokhoz kapcsolható a pH 6.5-7.0 értéken való reakcióval.

A patkányokban levő humán szérum albumin esetében a felezési idő durván lineárisan változott a protein pI-jével, kb 4.6 órától a nativ albumin esetében (pI=4) 0.8 óráig a 9.5 feletti pI-nél. A

feltisztulás feltételezhetően egy összetett mechanizmus eredménye, mely magába foglalja a megnövekedett pI-vel való retikuloendoteliális rendszerbe való feltételezett megnövekedett felvételt is. A patkány tripszinogénekénél a verziók közötti szérums felezési idők közötti eltérések pI 5.-0 ($t_{1/2}$ 4 perc) esetében még nagyobbak voltak. Így a pI egyértelműen fontos változónak tűnik ezen proteinek szérums felezési idejében.

A következő táblázat példákat mutat a mono-cys tetramerek közötti keresztkötőkre, mely keresztkötők a teljes komplex izoelektromos pontját csökkentik.

Forrás

Szekvencia

poliasp vagy poliglu	COCH ₂ I	COCH ₂ I	n feltehetően $\geq 10-12$
			X = D vagy E ⁻
	Ac-K- (X) _n -K		

"	"	COCH ₂ I	IH ₂ COC	n > 2, hogy
				rugalmasságot
		Ac-K- (G) _n - (X) _m - (G) _n -K biztosítson az		
				egyes végeken,
				m $\geq 10-12$, X=D ⁻
				vagy E ⁻

"	"	COCH ₂ I	COCH ₂ I	n $\geq 5-6$, m $\geq 10-12$
				X = D ⁻ vagy E ⁻
		Ac-K- (GX) _n -K		

A javasolt keresztkötők közül sok egyesíthet legalább két, felté-

telezhetően három tulajdonságot a potenciális további hatáshoz.

Lehetséges, hogy a peptid keresztkötőkben levő egyedi amino csoport közvetlenül jódacetilálható a peptid szintézise során jódecetsavval mint az utolsó hozzáadandó aminosavval való kezeléssel, a gyantán levő lizin aminos csoportok védelmének megszüntetése után. Ebben az esetben a lizinek ortogonálisan védhetők N-FMOC-kal vagy N-nitropiridinszulfenil csoportokkal vagy BNPEOC-kal. Ez jelentősen egyszerűsítheti szintézisüket.

A szintézis részeként szereplő jódacetiláció eltérő módszere magába foglalja az sge1.1-SH vagy a peptid keresztkötő szulfhid-rilekre és aminokra specifikus heterobifunkcionális keresztkötővel, mint pl a szulfo-SMCC vagy hasonló a Pierce Chemical Co.-tól beszerezhető (Rockford, IL) való reagensekkel való reakcióját.

Genetikailag fúzionált poli(tetramer) hemoglobinok

A multimer (pl politetramer) hemoglobin előállításának egy másik megközelítése magába foglalja az egyéb kötőket felhasználó egyéni tetramerek genetikai fúzióját. Két vagy több tetramer köthető, a kívánt molekulasúlytól és a végső molekula hajtodásának eredményességétől függően. A di-alfa vagy di-béta Hgb eltérő tetramerjeiből származó dialfa (vagy dibéta) alegységek genetikailag fúzionáltathatók egymáshoz egy kinyújtott polipeptid létrehozásához, mely köti az egyedi pszeudotetramer doméneket.

A proteolitikusan stabil nyújtott polipeptid kötések előre láthatóak. A kívánatos kötő tulajdonságok közé a következők tartoznak: 1) az egyes végeken levő glicinek, biztosítsanak rugalmasságot a dialfa (vagy béta) terminális doménekbe belépve,

és szüntessék meg a dialfa (vagy béta) terminális domének kötő másodlagos szerkezetéhez való kapcsolódását: 2) merevség a tetramerek széparálásához, kinyerhető egy nyújtott szerkezettel mint amilyen a poliprolin hélix vagy poliglutamáttal vagy poliaszpartáttal; és 3) a proteázokkal szembeni semlegesség (vide supra vagy mint a kollagén szekvenciában). Az alábbiakban számos ilyen szekvenciát soroltunk fel. Nyilvánvalóan bármely más ebben a specifikációban említett peptid kötő kipróbálható miután szterikusan modelleztük a fuzionált dialfa (vagy dibéta) terminusok környezetét. A kötők egy dialfa C-terminusától a következő N-terminusa felé kell haladjanak és egy egyedüli génként szintetizálандók. A proteáz rezisztens vagy negatív töltésű másodlagos szerkezet szegmentek modellezésén túl egy vagy több Artemia kötőt kell modellezni a tetramerek között. A béta láncok szintén kapcsolhatók ezen a módon, bár a protein funkciójára kifejtett hatása ismeretlen. Lehetőség van egy további láncközötti keresztkötőkkel rendelkező vagy nem rendelkező intermolkeuláris di-béta (sgel.1) létrehozása is.

<u>Forrás</u>	<u>Szekvencia</u>
poliprolin hélix	di α vagy β C term-(G)n-(P)n-(G)n-di α vagy β N-terminus n feltételezhetően ≥ 3 , m feltételezhetően $\geq 10-12$
poliaszpartát vagy glutamát	-(G)n-(D)n-(G)n- (a komplex pI-jét csökkenti)
Artemia kötő (példa)	-(G)n-LRRQIDLEVTGL-(G)n-; n ≥ 0 (2. számú szekvencia)
egy helikális csavart orsó	-(G)n-KCAELEG(KLEALEG) ₄ <- - nem fuzionált a terminushoz (oktamert

kell képezzen a csavart orsó keresztkötéssel
(3. számú szekvencia)

A következők szerint határoztuk meg az intertetramer kötő minimumát. A humán hemoglobin A₀ két szerkezetét (vagy mind a kettő az oxi vagy mindkettő a dezoxi formában) - melyeket a Brookhaven Protein Data Bank-tól szereztük vagy állítottuk össze - a lehető legközelebb helyeztük egymáshoz bármely maradék közötti van der Waals átfedések nélkül az Insight (Biosym. Inc., San Diego, CA) programot használva. Az alfa lánc C terminális arg 141 maradékától az alfa lánc N terminális val 1 amino terminális nitrogénjéig terjedő távolság (az egyik szerkezetben) ezután mérhető. A távolság kb. 22 Å volt ha mind a két molekula az oxi szerkezetben volt és kb. 18 Å ha mind a két molekula a dezoxi szerkezetben. Az oxi és a dezoxi szerkezetekben az alfa lánc N terminusánál levő valin kitett állapotban van a szerkezetben levő hasadék oldalán, míg az arg karboxitát a hasadék alján található. Így lehetőség nyílik ezen két terminus genetikai fúziójára a terminális aminosavak körüli maradékok nagy szerkezeti elmozdítása nélkül. Egy megfelelő intertetramer kötő legalább 18-22 Å hosszú, előnyösen hosszabb a szerkezetnek adandó nagyobb rugalmasság biztosítása céljából. Nincs rögzített felső határ a kötő hosszúságát illetően, azonban minél hosszabb a kötő, annál érzékenyebb a proteázzal szemben és ha a molekula elég nagynak tűnik a retikuloendoteliális rendszer makrofágja általi fagocitózisnak eshet áldozatul. Az alábbiakban néhány alkalmas kötőt soroltunk fel.

Egy alternatív fúzió előre látható az egyik hemoglobin csonkitott alfa lánca és a második hemoglobinban levő N terminális alfa val 1 között. Az első molekula csonkitott lehet a ser

138-nál, mely esetben az intermolekuláris N terminális és a C terminális közötti távolság kb. 17 Å (dezoxi) és 22 Å (oxi) és az ezen távolságot áthidaló genetikailag inzertált kötőket az alábbiakban soroltuk fel.

Igy két hemoglobin molekula köthető (két intermolekuláris alfa domén fúziója révén) egy fúziós protein létrehozása céljából, melynek mérete megközelítően kétszerese a normál humán hemoglobinnak. Egy további intramolekuláris keresztkötő, ahogy azt az rHb1.1-be bejuttattuk a hemoglobin dimerekké való disszociációjának kivédésére, is beleérthető, négy alfa domén fúzióját eredményezve.

Azt várjuk, hogy a genetikailag inzertált kötések satbilak lesznek a proteázok jelenlétében is, a kötést körülvevő két hemoglobin révén biztosított szterikus elzárásnak köszönhetően. Ez a rezisztencia talán tovább fokozható glicinek használatával, melyek között a kötés kevésbé érzékeny a proteázokkal szemben, mivel a proteázok a glicintől eltérő maradékokra irányuló oldalánc specifitással rendelkeznek és így gyenge a K_m érték ezen szubsztrát esetében a proteázoknál. Egy poliprolin hélix is alkalmazható kötőként a proteázokkal szembeni stabilitás fokozásához. Egy poliglutamát vagy poliaszpartát kötőként való fúziója egy sokkal alacsonyabb izoelektromos pontot tesz lehetővé a komplex esetében és így egy sokkal hosszabb szérum felezési időt.

A pszeudooligomer polipeptidekbe való beépítéshez való intertetramer kötők

Kötő	vég-vég távolság	konformáció	Megjegyzés
$-(\text{gly})_7-$	25 Å	nyújtott	minimális hossz a gly kötő esetében az oxi és a dezoxi szerkezetekben levő terminusok áthidalásához. Hosszabb kötők (20-50 maradékig) szintén jók lehetnek.
$-(\text{gly})_{1-3}(\text{ala})_{12-}$ helix	20 Å 40 Å	Ala a jobb- kezes alfa hélixben	A Gly-t a rugalmassághoz biztosítjuk és az N és C terminusokkal való fúziójuk körüli Hb szerkezet minimális zavarásának biztosításához. A hossz a glicinek számától és a nyújtás mértékétől függ.
$-(\text{gly})_{1-3}(\text{pro})_{12-16-}$ -prolin helix	21 Å 48 Å	pro a bal- kezes poli- prolin hé- lixben	12, 14, 16 prolin. A hosszúság a prolinok és glicinek számától függ.
$(\text{gly})_{1-3-}$	26 Å-		Az asp maradékok negatív
$(\text{asp})_{1-30-}$ (gly_{1-3})	49 Å		töltéseket adnak

Más maradékok helyettesíthetők be ezekbe a kötőkbe, míg hosszúságukat alapjában véve meghagyjuk. Ezek közé tartoznak

olyan kötők, melyeket egészében véve más ismert humán proteinek-
ből, mint pl a hemoglobin szekvenciájából vettünk, hogy kivédjük
a multimer idegen proteinként való bármilyen felismerését.

A 18 Å maximális hosszánál nagyobb és 22 Å-nél rövidebb
kötők használata eltérően stabilizálhatja a dezoxi szerkezetet és
alacsonyabb oxigén affinitást eredményezhet a multimer esetében.

Pszeudooligomer globin használata nélkül létrehozott oktamer
hemoglobinok

Lehetség van egy oktamer hemoglobin magasabb multimerek
alapvető termelése nélküli létrehozására is az alfa vagy a béta
lánc megfelelő cisztein mutációival (lásd az 5. ábrát).

A béta lánc génben (tetramerenként kettőt adva) vagy az alfa
lánc génben (tetramerenként szintén kettőt adva) egy X-cys
mutációt tartalmazó hemoglobin mutánsok - melyben a ciszteinné
mutáltatott maradékok vagy rajta vannak az alegység felszínén
vagy nagyon közel vannak ahhoz vagy nagyon közel vannak az
alegységeket elválasztó diád axisához - két diszulfiddal kötött
oktamert (két hemoglobin) hozhatnak létre. Az ilyen mutánsok
polimerizációját késleltetni kell a két diszulfid egymáshoz való
közelségével oly módon, hogy miután az egyik diszulfid létrejött
egy harmadik bejövő hemoglobin szterikusan gátolva legyen a két
eredeti hemoglobinon levő szabad ciszteinnel való reakcióban.

Mivel lehetséges, hogy ez a mutáns nagyobb polimerizációs
fokot ér el (az egyszerű oktamernél nagyobb) egy hígított
oldat használható in vitro a diszulfid kötések létrehozásához. A
hemoglobin polimerizációjának kinetikája legalább két nagyságren-

dű kell legyen (vagy nagyobb) a hemoglobin koncentrációban, míg miután az egyik diszulfid létrejött a második diszulfid két tetramer közötti megvalósulása 0 rendű legyen a hemoglobinban. Így a polimerizált termék : oktamer arányának csökkennie kell a hemoglobin koncentráció csökkenésével. Ha az oktamerek képződését oxigenált közülmények között hajtjuk végre az oktamer vs polimerek hozama tovább fokozható, mivel a két cisz mutáció közötti távolság a dezoxi szerkezetnél kisebb minden egyes esetben az oxi hemoglobin szerkezetben.

Az alábbiakban a béta lánc és az alfa lánc előnyben részesített mutációs helyeinek listáját mutatjuk be:

Béta és alfa lánc mutációs helyek az X -cys mutációkhoz a diszulfid hiddal kötött oktamer hemoglobin létrehozásához.

Lánc/ Mutáció	Régi távolság (Å)	Új távolság (Å)	Megjegyzés
béta Asn 80 - cys	22	18	nincs felsorolt kóros mutáció, az asn 80 a felszínen van
béta Asp 70 -cys	24	22	a Hb Tampa ^a (asp - tyr) nem rendelkezik fő abnormális tulajdonsággal; Hb G-His-Tsou (asp - gly) megnövekedett O ₂ affinitású, a felszínen van.
alfa Asn	24	20	a felszínen van, nincs fő ^a abnor-

78 - cys			mális tulajdonsága az asn78 ismert mutációinak
alfa Asp	22	18	a felszínen van, nincs fő abnormális tulajdonsága az asp75 ismert mutációinak
75 - cys			lis tulajdonsága az asp75 ismert mutációinak
alfa Asp	26	20	a felszínen van, nincs fő ^a abnormális tulajdonsága az asp74 ismert mutációinak
74 - cys			lis tulajdonsága az asp74 ismert mutációinak

^a R.N. Wrightstone. Polices of International Hemoglobin Information Center (IHIC), Comprehensive Sickle Cell Center, Medical College of Georgia. 1988.

Gén szerkesztés és expresszió

Az egyedi polipeptid láncokat kódoló DNS szekvenciák lehetnek genom, cDNS és szintetikus eredetűek vagy ezek kombinációi. Mivel a genom globin gének intronokat tartalmaznak a genom DNS-t vagy a premessenger RNS-t megfelelően összeilleszteni képes gazdában kell expresszálni, vagy az intron kimetszésével módosítani kell. Egy legalább részben szintetikus gén használatát számos okból előnyben részesítjük. Először, a kívánt aminosavakat kódoló kódonok úgy szelektálhatók, hogy egy egyedüli vagy közel egyedüli restriktációs helyet biztosítunk a megfelelő pontoknál a szekvenciában, így elősegítjük a a szekvencia gyors kazettás mutagenézissel való változtatását. Másodszor, a kódon szelekciót egy szelektált gazdában való expresszió optimalizálásához végezzük. Az E. coli-ban való kódon preferenciákhoz lásd

Konigsberg, et al., PNAS, 80:687-91 (1983). Végül, a messenger RNS transzkript által létrehozott másodlagos szerkezetek beavatkozhatnak a transzkripcióba vagy a transzlációba. Ha ez így van, ezeket a másodlagos szerkezeteket kiküszöbölhetjük a kódon szelekció megváltoztatásával.

Természetesen ha egy kötőt használunk az alegységek genetikai keresztkötéséhez a kötő normálisan egy szintetikus DNS által kódolt.

A találmány nem korlátozódik semmilyen különös gazdasejt, vektor vagy promóter használatára. A gazdasejt lehet prokarióta vagy eukarióta, ez utóbbi esetben lehet egy növény, rovar vagy emlős (ideértve az embert is) sejt is. A sejt lehet bármilyen megfeklelő szövet típusból való ideértve inter alia egy erithrocita. Azonban az előnyben részesített gazdasejtek bakteriális (különösen E. coli.) és élesztőgomba (különösen S. cerevisiae) sejtek. A választott promóter működőképes kell legyen a kívánt gazda sejtben. Ez előnyösen egy indukálható promóter, mely az indukció révén nagyobb arányú transzkripciót biztosít. Az előnyben részesített bakteriális promóter a Tac promóter, egy DeBoer által teljesen leírt (U.S. 4,551,433, és a Pharmacia LKB-től megvásárolható) trp/lac hibrid. Más felhasználható promóterek közé tartoznak a hőérzékeny lambda P_L és a P_R promóterek, valamint a lac, trp, trc, pIN (lipoprtoein promóter és lac operátor hibrid), gal és hősokk promóterek. A használt promóter nem kell hogy megegyezzen bármilyen természetesen előforduló promóterrel. A promóterek tervezéséhez utmutatást az olyan promóter szerkezetekkel végzett kutatások biztosítják, mint Harley és Reynolds vizsgálatai (Nucleic Acids Res. 15:2343-61, 1987) és az itt idézett közlemények. A promóter első struktúr génhez viszonyított elhelyezkedése optimalizálható. Lásd Roberts et al., PNAS (USA),

76:760-4, (1979). Egy egyedüli promóter használata előnyben részesül. A megfelelő élesztőgomba expressziós rendszereket részletesen a találmány más részében irtuk le.

A használt vektor olyan vektor kell legyen, mely rendelkezik egy a gazdasejtben működőképes replikációs origóval. Kívánatos hogy rendelkezzen a globin gének inzertációjához való egyedi restriktációs helyekkel is, valamint szabályozó elemekkel és megfelelő szelektálható markerrel. Egy vektor módosítható a restriktációs helyek bejuttatásához vagy eliminálásához, hogy a további manipulációkhoz alkalmasabbá tegyék a vektort.

A multimer hemoglobin alkotórészekből álló polipeptid láncai vagy közvetlenül expresszálhatók vagy a fúziós proteinek részeként. Ha fúziós proteinként expresszálódnak ez utóbbi magába foglalhat egy olyan helyet, ahol hasíthatók a globin-nal kapcsolatos egység idegen polipeptidtól való elszabadítása céljából. Ha ez így van, a Faktor Xa enzimmel szemben érzékeny hely biztosítható, ahogy azt Nagai és Thorgenson állítják (EP Appl. 161,937), melyet a hivatkozás révén a találmányba építettünk. Másik lehetőségként a fúziós proteinek szintetizálhatók, hajthatók és haem építhető be egy hemoglobin analóg létrehozása céljából. Az alkotórészekből álló polipeptid közvetlen expressziója kívánatos.

A bakteriális mRNS-ben a messengerhez kötődő riboszóma kötődési helye egy polipurin szakasz, mely a start (AUG) kódontól 4-7 bazisra található upstream irányban. Ezen szakasz konszenzus szekvenciája az 5'...AGGAGG...3', és gyakran a Shine-Dalgarno szekvenciaként utalnak rá. (Shine and Dalgarno, Nature, 254:34, 1975) Az SD szekvencia és a transzlációs start kódon közötti pontos távolság és ezen "spacer" régió alap szekvenciája befolyásolja a transzláció hatékonyságát és empirikusan optimalizálható. (Shepard, et al., DNA 1:125, 1985; DeBoer, et al., DNA 2:231,

1983; Hui, et al., EMBO J., 3:623, 1984)

Továbbá, maga az SD szekvencia módosítható az expresszió megváltoztatásához. (Hui and DeBoer, PNAS (USA), 84:4762-66, 1987) A riboszóma kötő helyek összehasonlító vizsgálata (mint amilyen Scherer, et al., vizsgálata, Nucleic Acids Res., 8:3895-3907, 1980) utmutatóul szolgálhatnak a megfelelő bázis cserékhez. Ha a hemoglobint az E. coli-tól eltérő gazdában akarjuk expresszálni azon gazda által előnyben részesített riboszóma kötő helyet kell biztosítani. (Zaghibil and Doi, J. Bacteriol., 168:1033-35, 1986).

Bármely gazda felhasználható, mely felismeri a szelektált promótert és a riboszóma kötő helyet és mely képes a haemet szintetizálni és beépíteni. Bakteriális és élesztőgomba gazdákat részesítünk előnyben.

Az intracellulárisan összeépített hemoglobin a termelt sejtekből nyerhető ki és tisztítható a tudomány által ismert technikákkal.

Policisztronos expresszió baktériumokban

Bár nem szükséges, kívánatos lehet, hogy az alegység, ha baktériumban expresszáljuk, ugyanabban a sejtben ko-expresszáldjon, mégkívánatosabb, hogy policisztronosan ko-expresszáldjon. A policisztronos operon egy egyedüli messenger RNS transzkriptet kódol, mely 1 promóter szekvenciával de kettő vagy több start és stop kódon párral rendelkezik, mely párok pontosan meghatározzák a transzlálható szekvenciákat. Az összes ilyen szekvencia "cisztronként" ismert és a cisztronoknak megfe-

lelő polipeptidek így az egyedüli promóter szabályozása alatt ko-expresszálnak.

A bakteriális operonok döntő többsége policisztronos, azaz számos eltérő gén transzkripciója megy végbe operonjuk egyedüli üzeneteként. A példák közé tartozik a laktóz operon három kötött génnel (lacZ, lacY és lacA) és a triptofán operon 5 kapcsolódó génnel (trpE, trpD, trpC, trpB, trpA). Ezekben az operonokban a messenger RNS szintézise a promóternél kezdődik, és a transzkripción belül, a kódoló régiókat különböző hosszúságú intercisztronos régiók választják el. (egy operon olyan gének egy csoportja, melyek egy egyedüli transzkripciós genetikai egységként állnak szabályozás alatt). A transzlációs hatékonyság cisztronról cisztronra változik. (Kastelein, et al., Gene 23:245-54, 1983)

Ha az intercisztronos régiók hosszabbak, mint a riboszóma rése (kb 35 bázispár), egy cisztron stop kódonnál való disszociációját egy független iniciáció követi a következő cisztronnál. Rövidebb intercisztronos szakaszok esetében vagy átfedő cisztronoknál a termináló riboszóma 30S alegysége nem disszociál a policisztronos mRNS-ről, mivel állandóan vonzódik a következő transzlációs iniciációs helyhez. (Lewin, Gene Expression, 143-148, (John Wiley & Sons: 1977)).

A bakteriális mRNS-ektől eltérően az eukarióta mRNS-ek általában monocisztronos természetűek. (Lewin, Gene Expression, 157).

Egy megvalósulásban a két vagy több alkotórészt tartalmazó polipeptidet kódoló gének expresszióját egy egyedüli promóter irányítja és a gének oly módon rendeződnek, hogy a policisztronos messenger RNS transzkript átiródik, melyből az elkülönült globinszerű polipeptidek ezt követően transzlálódnak. Azonban, a találmány magába foglalja a szeparált promóterekből való eltérő

polipeptidek ko-expresszióját, azaz a gazda szeparált alfa és béta globin mRNS-eket ír át.

Ideális esetben, az alfa és béta globin-szerű domének stoichiometriásan azonos mennyiségben expresszálnának. Míg egy egyedüli promóter nem garantálja az azonos mennyiséget, megszüntet egy egyensúlytalanságot okozó hatást -- a transzkripcióban levő eltéréseket, melyek a promóter erősség és elérhetőségben meglevő különbségeknek tudhatók. Ha a promóter erősségben levő eltéréseket minimalizáljuk ugyanazon plazmidon levő két azonos promóter használatával, a plazmid stabilitás csökkenne, mivel hajlama lenne a homológ régiók rekombinációjára.

Előnyösen az alfa és béta globin-szerű doméneket úgy rendezzük el, hogy a riboszóma az alfa globin cisztronokat transzlálja először. Ennek magyarázata az, hogy van alapja annak a véleménynek, hogy az alfa globin hatással van a béta globin hajtodására. Azonban a gének pozíciója úgy állítható, hogy a béta globin-szerű domén szintetizálódjon először.

A policisztronos mRNS transzkript stabilitása, alfa és béta globin-szerű polipeptidekké való transzlációjának hatékonysága és a globin láncok tetramer hemoglobinná való hajtodása módosítható az intercisztronos régiók hosszának és bázis szekvenciájának (ez a régió az egyik cisztron stop kódja és a következő cisztron start kódja között fekszik), és egy első cisztronra vonatkozóan egy második cisztron egymásutániségének, és a megelőző cisztronra vonatkozó egy cisztron riboszómális kötő hely pozíciójának és szekvenciájának megváltoztatásával.

Egy előnyben részesített megvalósulásban az alfa és a béta globin-szerű polipeptid gének mindegyikét egy rövid "bevezető" cisztron vagy "riboszómális terhelő" előzi meg, mely elősegíti a globin cisztron ezt követő transzlációját. A 2. Ábrán az A régió

két cisztront tartalmaz és az egyes cisztronokat megelőző Shine-Dalgarno szekvenciákat. Az első Shine -Dalgarno szekvenciát (SD#1) a riboszóma köti, mely azután az első cisztront transzlálja, mely egy oktapeptidet kódoló rövid cisztron. (Erre a cisztronra "bevezető" cisztronként vagy "riboszómaállis terhelőként" utalnak.) A második cisztron egy globin gén, ebben az esetben egy FX alfa-globin gén. A második cisztron transzlációját elősegítő Shine-Dalgarno szekvencia (SD#2) az első cisztronon belül helyezkedik el. Ebből kifolyólag a kettőt "transzlációs szempontból kapcsoltnak" nevezik. A B régió szerkezetileg azonos, azzal az eltéréssel, hogy a második cisztron FX-béta globint kódol. Az A és a B régiók között egy 43-bázisú intercisztronos régió található. Az A és a B régió bevezető cisztronjai megfelelnek a Schoner et al. (Meth. Enzymol., 153:401-16, 1987) által pCZ144-nek jelzett két-cisztronos expressziós rendszer első cisztronjának. A jelen találmány azonban nem korlátozódik a Schoner et al., által ismertetett adott "starter" cisztronra; más bevezető cisztronok, melyek lehetővé teszik a következő cisztron magas szintű transzlációjának újratekzdését szintén alkalmazhatók.

Az intercisztronos szekvenciák megtervezéséhez és az SD szekvenciák elhelyezkedéséhez az utmutatás az azonos policisztronos operon spontán és szabályozott mutánsainak transzlációs hatákonysága összehasonlításával nyerhető, ahogy azt Schoner et al (PNAS, 83:8506-10, 1980) példázzák. Lehetséges az eltérő operonok intercisztronos régióiban való konszenzus tulajdonságok keresése is. McCarthy, et al., (EMBO J. 4:519-26, 1985) egy transzlációt fokozó intercisztronos szekvenciát azonosított az E. coli atp operonban.

A jelen találmány célja a hemoglobin vagy annak alkotó polipeptidjeinek inkluziós testekbe való lokalizációjának csök-

kentése vagy elkerülése. Következésképpen a találmány egy további jellemzője az, hogy a funkcionális hemoglobin alapjában véve (előnyösen több mint 80 %-a) a sejt oldható frakciójában található. Ugy tűnik, hogy ezzel a találmánnyal a funkcionális hemoglobin több mint 90 %-a így irányítható ha $\alpha_2\beta_2$ hemoglobint állítunk össze az itt leírt tetracisztronos operonból ko-expresszált alfa és béta globin láncokból. A di-alfa β_2 hemoglobinnal majdnem 100 %-os az oldhatóság ha az expressziót 25 °C hőmérsékleten indukáljuk és kisebb, ha magasabb indukciós hőmérsékleten. Ezek a százalékok a sejt oldható frakciójában talált összes di-alfa és béta lánc százalékát tükrözik és nem a sejtől való protein aktuális kinyerését.

Élesztőgombában való expresszió

Egy másik megvalósulásban a találmány hemoglobin-szerű molekulák élesztőgombában való termelésére vonatkozik. Az expresszióhoz az előnyben részesített gazda a Saccharomyces cerevisiae. Azonban fonalgombák vagy más élesztőgombák is használhatók erre a célra, mint pl. az Aspergillus vagy a Pichia törzsei. Ahhoz, hogy egy élesztőgomba megfelelő gazda legyen képes kell legyen replikálódó vagy integrálódó típusú rekombináns vektorokkal való transzformálódásra. Ez lehetővé teszi a kívánt DNS szekvencia kérdéses génbe való inzertálását. Képes kell legyen a nagy sűrűségű sejt szaporodásra megfelelő mennyiségben, hogy elegendő sejttömeget biztosítson, hogy a kívánt reakció tartályból a kívánt géntermék izolálható legyen, ahol ideálisan a szaporodás könnyen szabályozható számos paraméterrel, melyek közé a követke-

zők tartoznak: tápközeg formulázás, rázatás és oxigén transzfer és hőmérséklet. Kivánatos lehet, hogy a protein szintézis expressziója indukálható legyen a tápközeg, a hőmérséklet manipulálásával, vagy bizonyos vegyszerek hozzáadásával vagy elvonásával. Végül, ahhoz, hogy megfelelő gazda legyen, az élesztőgomba képes kell legyen rekombináns proteinek termelésére, előnyösen a teljes sejt protein 1 %-os fölöslegében. Ez lehetővé teszi a kívánt rekombináns protein sokkal könnyebb izolálását.

A S. cerevisiae haploid vagy diploid törzse használható.

Például a következő diploid törzseket részesítjük előnyben:

BJY3505 x RSY330

BJY3505 x BGY1991

Más párosodások is felhasználhatók a találmány alkalmazásához.

Proteáz-hiányos törzsek felhasználása is előnyös lehet. Az élesztőgomba expressziós rendszerek két fő kategóriába sorolhatók: (1) protein szekretálására tervezett rendszerek és (2) a proteinek citoplazmás expresszálására tervezett rendszerek. Jelen esetben a citoplazmás expressziót részesítjük előnyben, mivel az élesztőgomba sejtek összehajtogatják a globin láncokat és beépítik a haemet a hemoglobin in vivo létrehozása céljából. Azonban lehetőség van az alfa és a béta globin láncok szeparált expressziójára és szekretálására is és a hemoglobin in vitro összeépítésére.

A globin gének egy megfelelő promóter szabályozása alatt kell legyenek. Az általánosan használt élesztőgomba promóterek általában két széles kategóriába sorolhatók: szabályozott és konstitutív. A széleskörűen használt konstitutív promóterek közé tartoznak a GAP, PGK (foszfoglicerát kináz) és az α -faktor promóter. Szabályozott promóterek szintén felhasználásra kerül-

nek, ezek közé a következők tartoznak: az élesztőgomba metallo-tionein promóter (a réz szabályozza), a Gal1-10 promóter, a GAL7 promóter (galaktóz és glükóz szabályozza) az ADHII promóter (etanol és glükóz szabályozza), a PHO5 promóter (foszfát szabályozza) és számos hibrid promóter, mint pl. a PHO5-GAP, GAL-PGK, ADHII-GAP és a GAL-CYC1.

A GAL-GAP hibrid promóter használatát előnyben részesítjük. Mindkét elem (a GAL_{UAS} és a GAP transzkripciós iniciációs hely) is jól ismert. A GAL "regulon" transzkripciós szabályozásának mechanizmusára irányuló kutatások meglehetősen széleskörűek voltak. A galaktóz regulon 5 a galaktóz hasznosításához szükséges enzimet kódoló gént foglal magába. Ezen gének közül négy (a GAL1, a GAL7, a GAL10 és a GAL2) csak a galaktóz jelenlétében expresszálódik. A galaktóz indukció nem fordul elő glükóz jelenlétében, hacsak az élesztőgomba törzs nem hordoz egy mutációt a REG1 génben. A GAL1, 7, 10 és 2 géneket legalább két másik gén szabályozza a GAL80 és a GAL4. A GAL4 egy transzkripciós aktivátor protein, mely a GAL1-től, 7-től, 10-től és 2-től upstream irányban elhelyezkedő aktivátor szekvenciákból (UAS_{GAL}) való mRNS szintézist aktiválja. Bár a GAL4 konstitutív módon expresszálódik funkcionálisan néma galaktóz hiányában. A GAL4 aktivitás repressziója galaktóz hiányában fennmarad a GAL80 gén terméke révén. A GAL80 gén nyilvánvalóan fizikai kölcsönhatásban van a GAL4-gyel a transzkripciós aktiválás kivédése céljából. Feltehetően a galaktóz vagy egy galaktóz származék kivédi ezt a kölcsönhatást hogy lehetővé tegye a GAL4 által közvetített indukciót.

A *S. cerevisiae* haploid törzsei három eltérő gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAP) enzimet kódoló génnel rendelkeznek. Ezeket a géneket TDH1-nek, TDH2-nek és TDH3-nak jelöltük és mindegyik egy egyedüli kópiában van jelen haploid

genomonként. A TDH3 gén a sejt GAP enzimjének megközelítően 60%-át termeli és a TDH1 és 2 sorrendben kb. 12 és 28 %-át (McAllister, L. and M.J. Holland, 1985, J. Biol. Chem, 260:15019-15027). Holland csoportja (Holland et al., 1981, J. Biol. Chem. 256:1385-1395; és Holland et al., 1983, J. Biol. Chem. 258:5291-5299) klónoztta és jellemezte a S. cerevisiae három GAP génjét. A klónokat pGAP11-nek pGAP63-nak és pGAP491-nek jelölték. A pGAP491 megfelel a TDH3 génnek és ezért ez expresszáldódik legerősebben.

Ez a promóter általánosan használt egy 600-850 bázispár hosszúságú fragmentként és alapjában véve nem szabályozott. Hosszú formájában ez egy nagyon erőteljes promóter. Az általunk használt forma csupán ~200 bp hosszúságú 5' irányban a transzlációs iniciációs helytől. Ez a forma erősítő szekvenciák hozzáadása nélkül alapjában véve a promóter hosszabb formájánál kevésbé aktiv (Edens, L. et al., Cell 37:629 (1984)). A GAL erősítő régió hozzáadása magasszintű expressziót és szabályozást biztosít. Csak a GAP491 promóterrel az alfa és béta globin a teljes sejt protein 0.2 %-ánál kisebb szinten termelődött; a GAL-GAP491 hibrid promóterrel az expresszió a teljes sejt protein 7-10 %-ára emelkedett.

Más hibrid promóterek is érdeklődésre tarthatnak számot: a GAL-SIGMA; a SIGMA-GAP; a GAL-EF III; a SIGMA-EF III.

Kigondolhatók más működőképes promóter rendszerek is. Ezek közé tartozik az ezekre való korlátozás nélkül számos konstitutív promóter. Például az élesztőgomba párosodási faktora (MFa) promóter vagy a párosodási faktor a promóter , az MF(a), a foszfogllicerát kináz promóter (PGK), a hexokináz1, a hexokináz2 a glükokináz, a piruvát kináz, a trióz foszfát izomeráz, a foszfogllicerát izomeráz, a foszfogllicerát mutáz, a foszfofruktóz kináz vagy az aldoláz promóterek is alkalmazhatók. Röviden, bármely jól

expresszált élesztőgomba promóter megfelelhet az élesztőgombában való hemoglobin expresszióhoz. A természetesen előforduló szabályozott promóterek széles köre is felhasználható, pl. GAL1-10, GAL7, PHO5, ADHII használtak az élesztőgombában való heterológ proteinek termeléséhez. Szintetikus vagy félszintetikus élesztőgomba promóterek is felhasználhatók, mint pl. a GAL-PGK, GAL-MF α -1, GAL-MFa1, GAL-SIGMA. Az ADHII szabályozó szekvenciák számos promóterből származó erős transzkripció iniciációs helyhez párosíthatók. A PHO5 szabályozó szekvenciák vagy a sigma elem szabályozó szekvenciák szintén felhasználhatók erőteljes hibrid promóterek megszerkesztéséhez. Az élesztőgomba promótereken túl elképzelhető egy olyan erőteljes prokarióta promóter használata, mint a T7 promóter. Ebben az esetben, a T7 polimeráz egy szigorúan szabályozott élesztőgomba promóter szabályozása alá helyezhető. A T7 promóter szabályozása alatt álló hemoglobin géneket hordozó élesztőgomba sejtekben való fág polimeráz indukciója lehetővé teszi a gének ezen nagyon hatékony fág polimeráz általi transzkripcióját.

Mivel a fent leírt élesztőgomba szabályozó szekvenciák többsége a transzkripció pozitív szabályozóiként szereplő proteinek céljaiként szolgálnak, elképzelhető, hogy korlátozzák a transzkripciót olyan szituációkban, ahol a cél szekvencia több kópiában van jelen. Ilyen szituáció olyan vektorokkal állhat fenn, mint a pC1B, pCIT, pC1U vagy a pCIN, melyek sejtenként 200 kópiánál nagyobb számban lehetnek jelen. A pozitív szabályozó (pl. a GAL4) túlexpresszállása fokozott expressziót eredményezhet. Lehetséges egy olyan törzs megszerkesztése, melyben a GAL4 gént úgy változtattuk meg, hogy eltávolítjuk promóterét és a promótert a GAL7 vagy a GAL1-10 promóterekkel helyettesítjük, melyek mindegyike sokkal hatékonyabban íródik át mint a GAL4 promóter.

Ebben az esetben a pozitív transzkripció aktivátor protein GAL4 emelt szinten expresszálna akkor, amikor a hemoglobin expresszióját indukáljuk.

A magasabbrendű eukarióta riboszóma kötő helyek konszenzus szekvenciáját Kozack határozta meg (Cell, 44:283-292, 1986) a következőnek: G^{AA}_GCCAUGG (10. számú szekvencia). Ettől a szekvenciától való eltérés, különösen a -3 pozícióban (A vagy G) nagy hatással van egy adott mRNS transzlációjára. Gyakorlatilag az összes erősen expresszált emlős gén ezt a szekvenciát használja. Az erősen expresszált élesztőgomba mRNS-ek másrészt különböznek ettől a szekvenciától és ehelyett az AAAAUGU szekvenciát (Cigan and Donahue, GENE, 59:1-18, 1987) használják. Az α és β -globinok expressziójához általunk használt riboszóma kötő hely megfelel a magasabbrendű eukarióta riboszóma kötő helynek. A találmány szándékán belül van az, hogy szisztematikusan megváltoztatjuk ezt az RBS-t az olyan változtatások hatásának tesztelése céljából, mely változtatások még inkább az élesztőgomba RBS-re emlékeztetővé teszik azt. Le kell szögezni, hogy a -2, -1 és +3 pozíciókban való változásokat úgy találtuk, hogy általában csak gyengén befolyásolják a transzlációs hatékonyságot élesztőgombában és emlősökben.

A gének S. cerevisiae-ben való intracelluláris expresszióját elsősorban a génnel kapcsolatos promóter erőssége, a plazmid kópia száma (plazmid eredetű géneknél), a transzkripció terminátor, a gazda törzs és a gén kódon preferencia mintája befolyásolják. Ha a géntermék szekréciója kívánatos, a szekréciós vezető szekvencia jelentőssé válik. Meg kell jegyezni, hogy sokkópiás plazmidok esetében az erős promóter szerkezetek csökkenthetik a szekréciós hatékonyságot. Ernst, DNA 5:483-491 (1986).

Számos extrakromoszómálisan replikálódó vektor (plazmid) áll rendelkezésre az élesztőgomba sejtek transzformálásához. A leg-
hasznosabb sokkópiás extrakromoszómális élesztőgomba vektorok a
hordozó vektorok, melyek egy teljes hosszúságú 2μ -kört használnak
egy E. coli plazmiddal kombinációban. Ezek a vektorok olyan
géneket hordoznak, melyek lehetővé teszik a plazmid megfelelő
élesztőgomba mutánsban való fenntartását és antibiotikus rezisz-
tencia markerek fenntartását, melyek lehetővé teszik az E. coli-
ban való szelkeciót. A teljes hosszúságú 2μ -kör használata a
részleges 2μ -szekvenciát tartalmazó vektorokkal szemben általában
sokkal nagyobb plazmid stabilitást eredményez, különösen az olyan
élesztőgomba törzsekben, melyekből korábban a 2μ plazmidot eltá-
volították. Az itt leírt vektorok pC sorozata ilyen típusu
vektorokat jelent.

A törzsek megszerkeszthetők oly módon is, hogy a GALGAP
hemoglobin expressziós kazettát integráltuk a kromoszómákba
élesztőgomba integráló vektorokat használva. Bár a hemoglobin
gén kópia száma kisebb kell legyen, mint a plazmid vektoroké,
ezek meglehetősen stabilak és talán nem igényelnek szelekciót a
gazdasejtben való fenntartáshoz. Az élesztőgomba integráló vektorok
közé tartoznak a Yip5 (Steuhl, et al., PNAS, 76:1035-39,
1989), Yip1 (Id.), és a pGT6 (Tchumper and Carbon, Gene, 10:157-
166, 1980). Az ezen és más élesztőgomba vektorokkal kapcsolatos
információkért lásd Pouwels, et al., Cloning Vector VI-I, et seq.
(Elsevier, 1985).

A kivánt globin-szerű doméneket kódoló gének szeparált
plazmidokkal, vagy ugyanazon a plazmidon is bejuttathatók.

Az erősen expresszált élesztőgomba gének nagyon magas kód-
egyoldalúságot mutatnak. A gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázt
és ADH-I-et kódoló gének például 90 %-os egyoldalúságot mutat egy

25 tagu kódonsorral szemben. Az erősen expresszált élesztőgomba gének (a teljes mRNS 1 %-nál nagyobb) élesztőgomba kódon egyoldalúsági indexe .090-nál nagyobb. A mérsékelten expresszált gének (a teljes mRNS 0.1-0.05 %-a) egyoldalúsági indexe 0.6-0.8, és az alacsony szinten expresszált gének (a teljes sejt protein 0.05 %-ánál nagyobb) kódon egyoldalúsága 0.10-0.50 (Bennetzen and Hall, J. Biol. Chem., 257:3026-3031, 1982). A humán α -globin cDNS-ének kodonjához számított érték 0.23. Hasonló érték számítható a β -globin cDNS esetében. Mivel nagyon erős korreláció van a leggyakrabban használt kódonok között, lehetséges, hogy a humán cDNS-ből való hemoglobin expresszió élesztőgombában korlátozható a megfelelő tRNS molekulák elérhetőségével. Ha ez így van, a leginkább előnyben részesített élesztőgomba kódonokat használó gének teljes szintézise fokozhatja az expressziós szinteket. Egészen valószínű, hogy az ártalmas kódon használat legnagyobb negatív hatása akkor lenne, ha a cDNS-ben használt olyan kódonok lennének bőségben, melyeket kis többségben levő tRNS-ek képviselnék. Egy ilyen esetben a magasszintű hemoglobin expresszió teljesen elszívna a tRNS molekulákat, ezzel csökkentve nem csupán a hemoglobin transzlációját, hanem olyan élesztőgomba proteinek transzlációját is, melyek szintén azt a kódot használják. Az α -globin humán cDNS esetében a legáltalánosabban használt leucin kódon a CTG (21-ből 14), ezt a kódot soha nem használják magasan expresszált élesztőgomba génekben (Guthrie and Abelson, The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Eds. Stratern, Jones and Broach, 1982. Cold Spring Harbor, NY). Az alacsony kódon egyoldalúsági index és a ritka élesztőgomba kódonok jelenléte a globin cDNS-ekben kellőképpen ösztönzött minket az alfa- és béta-globin gének módosított formájának szintetizálására, az előnyben részesített élesztőgomba kódonokat alkalmaz-

va.

Vegyes adatok

A csatolt igénypontok beépítésre kerültek a találmányba a hivatkozás révén az előnyben részesített megvalósulások további felsorolásaként. Az összes idézett irodalmi hivatkozást olyan mértékben építettük be a találmányba a hivatkozás révén, amilyen mértékben szükség van arra a találmány kivitelezéséhez ahogy itt és később leírtuk.

A leírt multimer hemoglobinok termelésében használt expresziós vektor készítmények előnyben részesíthetők a Budapesti Szerződés értelmében deponált következő vektorokkal, melyeket az American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA) törzsgyűjteménynél helyeztünk letétbe 1990 május 10-én:

ATCC 68323 pDL III-14c

Ez a pKK223-3 (Pharmacia LKB, Piscataway, New Jersey, USA) és a pGEM1 (PromegaCorp., Madison, Wisconsin, USA) származéka, mely az egyedüli Tac promóter által irányított policisztronos operon egy részeként szereplő des-Val alfa globin és des-Val béta globin részére hordoz szintetikus géneket.

ATCC 68324 pDL IV-8a

Ez a PDL III-14c egy származéka, mely egy alfa globin egységet kódoló fuzionált gént, egy glicint és egy második alfa globin

egységet, valamint második génként des-Val béta globint kódoló gént tartalmaz.

ATCC 20992 pGS 389

Ez egy olyan élesztőgomba vektor, mely a GALGAP promóterek szabályozása alatt expresszálja az alfa és a béta globint.

Ezen vektorok depozitja nem jogosít fel ezek előállítására vagy eladására.

1. példa

A di- α globin mono-cisztein (A71C, D75C, vagy S81C) mutáns expressziós vektor megszerkesztése

A következő plazmidokat, melyek előállítását részletesen Hoffman et al., irták le (W088/09179) manipuláltuk ebben a példában.

pDL II-83a plazmid

Egy Met iniciációs kódont, egy Faktor X helyet (Ile-Glu-Gly-Arg) (11. számú szekvencia) és egy humán alfa globint kódoló gént, melyre kollektíven FX-Aként utakunk, szintetizáltunk és az M13mp19 XmaI/PstI helyére klónoztuk. Az FX-A gént hordozó EcoRI-PstI fragmentet kimetszettük és a pKK 223-3-ba újra klónoztuk.

tuk, a Tac promóter szabályozása alá helyezve ezzel. Ezt a származékot pDLII-62m-nek neveztük. A pDLII-62m-ből az FX-A gént eltávolítottuk és az EcoRI-PstI-gyel linearizált pGEM1-gyel ligáltuk a pGEM-FX-A-t létrehozva. Ezt NdeI-gyel és EaqI-gyel emésztettük, eltávolítva ezzel a Faktor Xa-t kódoló szekvenciát (és az α globint kódoló szekvencia egy részét). A kimetszett fragmentet egy szintetikus oligonukleotiddal helyettesítettük, mely visszahelyezte a hiányzó α globin kódonokat; a kapott plazmidot pDLII-83a-nak neveztük. az expresszált protein a "Met-Val-Leu-...".

A pDLII-91f plazmidot, melyben a gén "Met-Leu..."-t kódol "Met-Val-Leu" helyett hasonlóképpen szerkesztettük meg a pGEM-FX-A-ból, de egy eltérő szintetikus helyettesítő oligonukleotiddal, melyből hiányzott a Val kódon.

pSGE 1.1 E4 plazmid

Ezt a plazmidot (mely SGE1.1-ként is ismert) az 1. Ábrában írtuk le. A pDLIV-8A plazmid SGE1.1E4 plazmiddá alakítható a következő eljárással.

A pDLIV-8a expressziós plazmid tartalmazza a dialfa kódoló szekvenciát, melyben az alfa globinokat egy egyedüli glicin kódon kapcsolja, valamint egy egyedüli Ptac promóter szabályozása alatt álló des-val béta globin géneket. A plazmid ampicillin rezisztenciát kódol, nincs funkcionális tetraciklin rezisztencia génje és Rop⁺ és Lac. Egy kereskedelemben beszerezhető kitet mint a DuobletakeTM (Stratagene, Inc.) felhasználó oligonukleotid által irányított hely specifikus mutagenézis alkalmazható a Presbyterian mutáció béta globin szekvenciába való

inzertálására.

AAC		AAA
TTG	->->	TTT
asn ¹⁰⁸		lys

Ezután a végső expressziós plazmidot az SGE 1.1E4-et (amp R, tet R, Rop-, Lac+) szerkesztjük meg egy funkcionális tetraciklin rezisztencia gén és a lacI gén inzertációjával, mely egy indukáló anyaggal való indukcióig a Ptac promótert gátló lac represszor proteint kódolja. Ezt a módosítást az alábbiakban írjuk le.

A plazmid első módosítása a lacI gén inzertálása. Ez a gén polimeráz lánc reakciós (PRC) amplifikációval szintetizálható a gyártók eljárásának megfelelően (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) az E. coli JM109 törzsének F episzómáját (FtraD36, proAB, lacIndeltaM15) használva szubsztrátként. A következő oligonukleotidok használhatók primerként:

előre irányuló:

5'-GCGGCCGCGGAAGAGTCAATTCAGGAGGGTG-3' (12. számú szekvencia)

fordított:

5'-GCGGCCGTCACCTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAA-3' (13. számú szekvencia)

A primerek 5' végeiken a NotI restrikciós enzim helyeket kódoló szekvenciákat tartalmaznak. A PRC amplifikációs reakció terméke tompa végű lehet és az expressziós plazmid PvuII helyére klónoozható. A PvuII helyet nem szerkesztjük újra ezen klónozó lépés alatt így a ligálást követő PuvII-vel való emésztés linea-

rizálja a *lacI* szekvenciát magábafooglaló plazmidokat. A lineárizált plazmidok nem transzformálják az *E. coli*-t. Mivel a primerrek csupán a *lacI* gén transzlált részével komplementerek, ez a fragment nem tartalmazza saját promóterét. Megjegyzendő, hogy a hemoglobin indukálhatósága vagy expressziója a *lacI* gén orientációjától függ, így a *lacI* gén inzertálása után az orientációt ellenőrizni kell. A helyes orientáció kisebb *EcoRI* fragmenttel rendelkezik, mint a nem helyes. Továbbá, a *lacI* represszor gén *PuvII* restrikciós helyre való inzertálása inaktiválja a *rop* génterméket és megnövekedett plazmid kópiaszámot eredményez.

A plazmid végső módosítása a funkcionális tetraciklin rezisztencia gén visszahelyezése. Ez a kereskedelembe beszerezhető pBR322 *EcoRI*-gyel való emésztésével végezhető el, amit az *EcoRI* átfedésekkel és egy belső *BamHI* hellyel komplementer 5' és 3' végeket tartalmazó szintetikus DNS kötő ligációján keresztül inzertációja követ. Ebből a tetraciklin rezisztencia 5' kódoló szekvenciáját tartalmazó módosított pBR322 vektorból származó *BamHI* fragmentet tisztítottuk agaróz gélelektroforézissel, majd a módosított pDL IV-8a plazmid *BamHI* helyére inzertáltuk. A *tet^R* fragment csupán egy orientációja eredményez tetraciklin rezisztenciát; a törzsek a helyes orientációra a megfelelő tápközegen való szaporítással szkrinelhetők. A *ter^R* fragment módosított vektorba való inzertálása visszaállítja a tetraciklin rezisztenciát és SGE1.1E4-et termel.

pGEM di-alfa plazmid

Az SGE1.1 E4 di-alfa gén hordozó *SmaI*/*PstI* fragmentjét *SmaI*/*PstI* hasításu pGEM 1-gyel ligáltuk a pGEM di-alfa létrehozása céljából.

1.1 Az α gén fágszkriptbe való szubklónozása

A desfxa pGEM (pDLII-83a) vektort EcoRI és PstI endonukleázokkal hasítottuk és az EcoRI/PstI-gyel emésztett fágszkriptbe ligáltuk (melyet a Stratagene-től szereztünk). A DH5 α E. coli törzset a ligációs eleggyel transzformáltuk és a sejteket 2xYT lemezekre szélesztettük, melyeket 10 μ l 100 mM IPTG-t, 25 μ l 2%-os X-Gal-t (DMSO-ban) és 150 μ l XL-1 sejteket (Stratagene) tartalmazó 3 ml fedőagarral befedtünk. A tiszta plakkokat izoláltuk és 37 °C hőmérsékleten XL-1 sejteket tartalmazó 2xYT tápközegben szaporítottuk. A tenyészetből kétszálu DNS-t izoláltunk és restrikciós analizissel és agaróz gélelektroforézissel ellenőritük az 500 bázispár hosszúságú α gén jelenlétére. Egyszálu DNS-t izoláltunk a desfxa fágszkript transzformánsok (f191 elnevezésű) egyikéből. Az egyszálu DNS-t szekvenáltuk a desfxa gén fágszkriptben való jelenlétének megerősítésére.

1.2 Mutagenikus oligonukleotidok

Három mutagenikus oligonukleotidot használtunk három független mutagenikus reakcióban. Az oligonukleotidok szekvenciája a következő volt (a mutáns kódot aláhúztuk):

Nigéria mutáció: α S81C

5' CCG AAC GCG TTG TGC GCT CTG TCT GAT 3'

(14. számú szekvencia)

α D75C

5' GGT GCT CAC GTT GAT TGC ATG CCG AAC GCG 3'

(15. számú szekvencia)

α A71C

5' CTG ACC AAC GCT GTT TGC CAC GTT GAT GAT 3'

(16. számú szekvencia)

1.3 Az A71C, D75C és az S81C mutagenikus oligonukleotidok kináz reakciójának körülményei:

1 μ l oligonukleotid (kb. 300 pmol)

2 μ l 10 mM ATP-t tartalmazó 10x kináz puffer

0.5 μ l T4 polinukleotid kináz (10 U/ μ l, New England Biolabs)

15.5 μ l H₂O

1 μ l 10 mM spermidin

A reakciót 1 órán keresztül inkubáltuk 37 °C hőmérsékleten, majd 80 μ l vizet adtunk hozzá és a reakciót 10 percig tartó hővel való inaktiválással állítottuk le.

1.4 Mutagenezises reakció

1 μ l fw 191 ss DNS (0.5 pmol)

3 μ l kináz oligonukleotid (vagy A71C, D75C vagy S81C kb. 45 pmol mennyiségben)

2 μ l 10x anneáló puffer (Promega)

14 μ l H₂O

a primer nélküli kontrol a következő:

1 μ l fw 191 ss DNS

2 μ l 10x anneáló puffer

17 μ l H₂O

A reakciót 65 °C hőmérsékleten végeztük, majd lassan lehűtöttük

35 °C hőmérsékletre (kb 70 perc alatt) és 5 percre jégre helyeztük. A következő reagenseket adtuk hozzá és a reakciót 37 °C hőmérsékleten 90 percig inkubáltuk:

- 3 µl x szintézises puffer (Promega)
- 1 µl T4 gén 32 protein (0.5 µg/µl, Biorad)
- 1 µl T! DNS polimeráz (3 U/µl, NEB)
- 0.5 µl T4 DNS ligáz (10U/µl, NEB)
- 5 µl H₂O

200 µl 71-18 mut S kompetens sejteket (a Promega Megváltoztatott Hely eljárása szerint készítettük) transzformáltuk az egyes mutagenézises reakciók 10 µl mennyiségeivel, 30 percig jégre helyeztük majd két percig 42 °C hőmérséklettel hősokkoltuk. A transzformációs elegyet hozzáadtuk 3 ml 2xYT tápközeghez és 37 °C hőmérsékleten (rázatás mellett) szaporítottuk 5.5 órán keresztül. Inkubálás után a három tenyészetből 1-1 ml-t eltávolítottunk, centrifugáltuk és 800 µl mennyiséget friss kémcsőben tároltuk 4 °C hőmérsékleten a mutáns fág törzsoldataként.

1.5. A D75C mutánsokra való szkrinelés

A D75C mutáns fág törzsoldat 10^{-5} higitásának 100 µl mennyiségét szélesztettük 153 mm 2xYT lemezeken 0.5 ml XL-1 sejteket tartalmazó fedőagarral bevonva. A lemezeket 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk kb. 5 órán keresztül. Nitrocellullóz szűrők duplikátumait leemeltük az egyes lemezekről és a plakkokat 6 ml 0.5 M NaOH/1.5 M NaCl-ben lizáltuk 10 ml 1 M Tris-HCl pH8.0/1.5 M NaCl elegyében semlegesítettük és 500 ml 6xSSC-ben mostuk. A szűrőket levegőn megszárítottuk és 75 °C hőmérsékleten 45 percig hevítettük. Ezután a szűrőket rövid ideig főztük 1 %-os SDS-ben

a prehibridizációt megelőzően. A szűrőket 20 ml oldatban prehibridizáltattuk 4 órán keresztül 68 °C hőmérsékleten. A prehibridizációs oldat a következőket tartalmazta:

- 5xSSC (20x SSC Maniatis receptje alapján elkészítve)
- 0.1 % (w/v) N-lauroilszarkozin
- 0.02 % (w/v) SDS
- 0.5 % blokkoló reagens (Genius Kit, Boehringer Mannheim)

A D75C oligonukleotidot $\pi^{(32)}$ ATP-vel jelöltük a következők szerint:

- 1 μ l oligonukleotid (80 pmol)
- 10 μ l 10x kináz puffer
- 1 μ l $\pi^{(32)}$ ATP (10 μ C/ μ l, a specifikus aktivitása > 3000 Ci/mmolnál)
- 87 μ l H₂O
- 1 μ l kináz (10 U/ μ l, NEB).

A reakciót 5 órán keresztül inkubáltuk 37 °C hőmérsékleten. A be nem épült ATP-t egy Biospin 30 oszlopon (Biorad) keresztül történő centrifugálással eltávolítottuk. A teljes próbát (17000 cpm/ μ l) hozzáadtuk a prehibridizációs keverékhez és a szűrőket egy éjszakán keresztül hibridizáltattuk 46 °C hőmérsékleten primer nélküli kontroll szűrőt is használva. A következő napon a szűrőket 10 percig mostuk szobahőmérsékleten (RT) 6xSSC-ben és egy éjszakára -70 °C hőmérsékleten Kodak X-Omat filmre helyeztük. A szűrőket 10 percig 57 °C hőmérsékleten 6xSSC-ben mostuk, megszáritottuk és egy éjszakán át exponáltuk, majd 10 percig 67 °C hőmérsékleten 6xSSC/0.1% SDS-ben mostuk, megszáritottuk és egy éjszakán át újra exponáltuk. Az utolsó mosás 10 percig tartott 70 °C hőmérsékleten 6xSSC/0.1 % SDS-ben, majd a szűrőket ismét

megszáritottuk és egy éjszakán át exponáltuk.

Tíz a mutáns oligonukleotidhoz eltérően hibridizálódott plakkot izoláltunk (a primer nélküli kontrollhoz viszonyítva). A plakkokat 5 ml 0.25 ml XL-1 sejteket tartalmazó 2xYT tápközegebe helyeztük. A tenyészeteket rázatva inkubáltuk 37 °C hőmérsékleten 7.5 órán keresztül. Az egyes tenyészetek 1 ml mennyiségeit eltávolítottuk, 5 percig centrifugáltuk friss csövekbe helyeztük és 4 °C hőmérsékleten tároltuk az ezt követő szekvenáláshoz és plakk tisztításhoz.

1.6 Az A71C és S81C mutánsaira való szkrinelés

Az A71C törzs fág mutagenézises reakció 10^{-3} higitásának 1 μ l mennyiségét és az S81C mutagenézises reakció 10^{-5} higitásának 20 μ l mennyiségét négy különálló 82 mm-es 2xYT/tet(10mg/ml) lemezekre szélesztettük, 3 ml fedőagart és 100 μ l XL-1 sejtet használva a fedőrétegezéshez. A fentiek szerint szélesztettünk egy primer nélküli kontrollt is. A lemezeket 37 °C hőmérsékleten 5 órán keresztül inkubáltuk; a plakkokat az egyes lemezekről nitrocellulóz szűrőkre helyeztük és a szűrőket egy éjszakán át száritottuk szobahőmérsékleten. A következő napon a plakkokat 0.5 M NaOH/1.5 M NaCl elegyével 3 percig lizáltattuk, 3 percig 1 M Tris-HCl pH 7.0/1.5 M NaCl elegyével semlegesítettük és 6xSSCben mostuk 5 percig. A szűrőket levegőn megszáritottuk, majd 75 °C hőmérsékleten 1 órán keresztül hőkezeltük. Ezután a szűrőket rövid ideig 1.5 %-os SDS-ben főztük a 6 órán keresztül 60 °C hőmérsékleten tartó prehibridizáció előtt, melyhez a fent leírt prehibridizációs oldatot használtuk.

1.7 Az A71C és az S81C oligonukleotidok digoxigenin felhasználásával történő jelölése

(Az összes reagenst a Boehringer Mannheim-től szereztük be.)

2 μ l A71C (100 pmol) vagy 1 μ l S81C (100 pmol)

10 μ l terminális transzferáz puffer

5 μ l 25 mM CoCl_2

1 μ l 1 mM dUTP-digoxigenin

30 μ l 04 31 μ l H_2O (sorrendben A71C és S81C reakciók)

1 μ l terminális transzferáz (25 U/ μ l)

A reakciókat 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk 3 órán keresztül, melyet egy 6 órás RT követett. Digoxigenin-jelölésű A71C és S81C próbákat (20 μ l) adtunk hozzá a megfelelő szűrőkhöz 10 ml prehibridizációs oldatban, a primert nem tartalmazó kontroll szűrővel együtt. A szűrőket egy éjszakán keresztül 47 °C hőmérsékleten hibridizáltattuk.

1.8 Szűrő mosás és előhívás

Az összes szűrőt először 6xSSC/0.1% SDS-ben mostuk 15 percig 30 °C hőmérsékleten majd 15 percig 42 °C hőmérsékleten.

A jelölt A71C vagy S81C oligonukleotidokkal próbáltatott négy szűrő mindegyikét elkülönítettük, majd fokozatosan emelkedő hőmérséklet mellett mostuk őket a primert nem tartalmazó kontroll szűrővel együtt. Az A71C és S81C szűrők mindegyikéből egyet 10ml 6xSSC/0.1 % SDS-t tartalmazó műanyag zsákba helyeztük és 10 percig mostuk a négy hőmérséklet valamelyikén azaz 50 °C, 60 °C, vagy 65 °C hőmérsékleten. A nagy hőmérsékleten való mosás után az egyes szűrő sorozatokat a Genius Kit eljárásának megfelelően előhívtuk.

Először a szűrőket tartalmazó zsákokat megtöltöttük 10 ml 100 mM Tris-HCl, pH 7.5/150 mM NaCl (A puffer) elegyével és 15 percig inkubáltuk. Ezután a puffert eltávolítottuk és 70.5 % blokkoló reagenst tartalmazó A pufferrel helyettesítettük, majd további 15 percig inkubáltuk RT-n rázatás nélkül. Anti-digoxigenin antitestet (2 μ l) adtunk közvetlenül az egyes zsákokhoz és 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A szűrőket ezután eltávolítottuk megfelelő zsákjaikból és együtt mostuk 15 percig 100 ml A puffer/0.05 % blokkoló reagens elegyében szobahőmérsékleten, melyet egy 15 perces A pufferben való mosás követett. Az utolsó mosás 100 ml 100 mM Tris-HCl, pH 9.5/100 mM NaCl/50 mM $MgCl_2$ (B puffer) elegyében történt 5 percig szobahőmérsékleten. Az adott hőmérsékletről származó szűrők egyes sorozatait külön zsákokba helyeztük 5 ml szin előhívó oldatba (5 ml 22.5 μ l 75 mg/ml NBT/15 μ l mg/ml X-foszfátot tartalmazó B pufferbe). A szűrőket 30 percig sötétben inkubáltuk szobahőmérsékleten. 30 perc után a szűrőket eltávolítottuk az előhívó oldatból, 5 percig mostuk 100 ml 10xTE-ben és 5 percig 100 ml 1xTE-ben, mindkét esetben szobahőmérsékleten. A szűrőket szobahőmérsékleten megszáritottuk.

A Genius Kit szkrinelési eljárás eredményeit felhasználva 10 az A71C vagy S81C jelölt oligonukleotidhoz eltérően hibridizálódott plakkot izoláltunk, majd 3 ml 0.25 ml XL-1 sejtet tartalmazó 2xYT tápközegebe helyeztük és 7.5 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk rázatás mellett. Az egyes tenyészetek 1 ml mennyiségeit eltávolítottuk, 5 percig centrifugáltuk, friss kémcsövekbe helyeztük és 4 °C hőmérsékleten tároltuk az ezt követő szekvenáláshoz és plakk tisztításhoz.

1.9 A mutációk megerősítése szekvenálással

Egyszálu DNS-t izoláltunk 800 μ l mutáns fág törzs felüluszból és szekvenálásnak vetettük alá a Sequenase kitet (USB), és primerként az α 179 oligonukleotidot használva. Az α 179 oligonukleotid egy 18-tagu homológ cys egy a mutációs helytől kb. 100 bázispárnyira upstream irányban levő régióig. A szekvenálás megerősítette az α A71C, α D75C és az α S81C mutációk jelenlétét

A fág törzsoldatot plakk tisztítottuk a 10^{-8} és 10^{-10} higítások 10 μ l mennyiségeinek 2xYT/tet (10 mg/ml) lemezekre való szélesztésével, melyeket 200 μ l XL-1 sejteket tartalmazó 3 ml fedőaggarral vontunk be. Hét órás 37 °C hőmérsékleten való inkubálás után egy egyedüli plakkot izoláltunk az egyes mutáns lemezekről és 90 ml 10 ml XL-1 sejteket tartalmazó 2xYT/tet (10 mg/ml) tápközeg inokulálására használtuk. A tenyészeteket egy éjszékán keresztül szaporítottuk 37 °C hőmérsékleten rázatás mellett. Az egyes mutáns fág törzsoldatból 1 ml mennyiséget eltávolítottunk, centrifugáltuk és a felüluszt -80 °C hőmérsékletre fagyasztottuk a megfelelően tisztított mutáns fág törzsoldataként. Kétszálu DNS-t preparáltunk a fennmaradó tenyészetből az ezt követő 1.1E4 expressziós vektorba való szubklónozási lépésekben való alkalmazáshoz.

1.10 Az α cys mutánsok 1.1E4-be való szubklónozása

A di- α gén di- α protein N-terminális vagy C-terminális doménjeiben levő három cisztein mutációval való megszerkesztéséhez három szubklónozási lépésre van szükség:

- 1) A cys mutáns α gén Eag1-Pst fragmentként fág szkriptből az Eag1-Pst1-gyel emésztett desval α pGem vektorba (pDL II-91f) való transzferálása. Ez a lépés biztosítja a mutáns α génnek a helyes 5' terminust.

2) A mutáns di- α gént, mely az egyes cys mutációkat a 3' α génben tartalmazza, úgy szerkesztjük meg, hogy az EagI DNS fragmentet a di- α pGem-ből (pGem di-alfa) a megfelelő cys mutáns desval α pGem plazmid EagI helyére inzertáljuk. Az 5' α génben a cys mutációt tartalmazó mutáns di α gént úgy szerkesztettük meg, hogy a BstBI DNS fragmentet a di α pGem-ből a cys mutáns desval α pGem plazmid BstBI helyére inzertáltuk.

3) Végül, az egyes mutáns di α géneket az 1.1E4 expressziós vektorba klónoztuk SmaI-PstI fragmentként.

A szubklónozási eljárásban az egyes lépéseknél a DH5 α -ba való transzformációkat úgy végeztük el, ahogy azt a β G83C mutáció 1.1E4-be való szubklónozásának módszerében leírtuk (lásd lent). A helyes α génben levő fontos cys mutáció jelenlétét szekvenálással megerősítettük a szubklónozási eljárás egyes állomásainál. Az 1.1E4-ben levő di α cys mutációk mindegyikét a 127-es E. coli törzsbe transzformáltuk, melyet TB komplett tápközegen szaporítottunk és IPTG-vel indukáltuk. A di α és β proteinek expresszióját SDS-PAGE és Western-lenyomat technikával erősítettük meg.

2. példa Két SGE1.1 monocys pszeudooktamer létrehozására irányuló oxidációjának eljárása

A kérdéses hemoglobin mutánsokat standard fermentációs táplevesben szaporított E. coli-ban expresszáltuk az IPTG-vel való indukció után. A sejteket pelletáltuk, 40 mM Tris-bázis, 2 mM benzamidin/gm sejt pép 3 mol mennyiségében reszuszpendáltuk, és egy MicrofluidizerTM-en (Microfluidics, Inc.) keresztül két lépésben lizáltuk. A lizátumot a sejt hulladék eltávolítása céljából centrifugáltuk és a felüluszt összegyűjtöttük. A

tetramer hemoglobint Mathews et al., módszertanában leírt módon (Methods in Enzymology, sajtó alatt) tisztítottuk a felüluszból. Röviden, a felüluszt 5 mM Trissel (pH7.0) hígítottuk míg a konduktivitás elérte a 200 μ mhos értéket. Ezután az oldatot 20 mM Trissel (pH7.0) ekvibrált Q Sepharose átfolyási ágyon vezettük át. Az átfolyást összegyűjtöttük az oldat pH értékét 8.0 értékre igazítottuk koncentrált NaOH-t használva majd egy második 20 mM Trissel (pH8.0) Q Sepharose oszlopra vittük fel. Az oszlopon befogott hemoglobint 20 mM Tris (pH8.0) 2 oszlop térfogatnyi mennyiségével mostuk és 20 mM Trissel (pH7.0) eluáltuk. A frakciókat összegyűjtöttük és az abszorbancia arányok alapján csoportosítottuk ($A_{575}/A_{540} > 1.03$). Az oldatot ezután puffer cseréltük MinitanTM-et (Millipore Corp.) használva 14 mM nátrium foszfátot (pH 8-8.5/150 mM kb. 100 mg/ml). Megjegyzendő, hogy a tisztítási eljárás ezen pontjánál a mutáns hemoglobin tetramerek már jelentős mennyiségű oktamert képeznek (> 20 %) a molekulába bejuttatott ciszteinek levegőn való oxidálódása következtében. Azonban a fennmaradó cisztein tiolok diszulfidekké való oxidációjának elvégzéséhez az oldatot levegő vagy oxigén alatt inkubáljuk megközelítően 48 órán keresztül 4 °C hőmérsékleten.

Inkubálás után az oktamereket szeparáljuk a nem reagált monomerektől és a magasabbrendű polimerektől 14 mM nátrium foszfáttal ekvibrált Sepharcil S-200-at használva, pH 8-8.5/150 mM NaCl a lineáris átfolyási sebesség 60 cm/óra. A frakciókat összegyűjtjük és a poolokat analitikai tisztaságú Superose 12 oszlopot használva vizsgáljuk.

Azon hemoglobin mutánsok esetében, ahol a cisztein helyettesítés a negatív töltés szoros közelségében található, vagy ahol a diszulfid képződés egyébként nem teljes, a fent leírt eljárást előnyösen módosítjuk a diszulfid képződés fokozása céljából. A

fent leírt eljárást használva az 50 mg/ml-re való koncentrálás után a hemoglobin oldatot karbon monoxi hemoglobinná változtatjuk CO-val való óvatos buborékolatással. Haemenként 5 Cu⁺⁺-t adunk az oldathoz 100 mM CuCl₂-öt használva és a hemoglobint CO alatt jégen inkubáljuk 5 percig. A reakciót ezután Na-EDTA ötszörös moláris feleslegben (a rézhez viszonyítva) való hozzáadásával állítjuk le. A kapott oktamereket ezután a fentiek szerint tisztítjuk.

3. példa Hipotetikus eljárás az alfa 1-béta 2 vagy alfa 2-béta 1 dimer interface régión keresztüli fúzióval a dimer képződés ellen stabilizált hemoglobin molekulák megszerkesztése

Az egyik alfa alegység C terminusa és a szomszédos alfa alegység N terminusa között jelenleg alkalmazott inter-*dimer di-alfa fúzió egy sikeres protein manipulálási megközelítést képvisel a hemoglobin dimer képzése elleni stabilizálásban. Ebben az esetben az eltérő dimerekből származó két terminus szerencsés juxtapozíciójából hasznot húztunk. Egy di-béta polipeptid is előállítható ahogy leírtuk, vagy egy di-alfa és di-béta polipeptiddel rendelkező hemoglobin, ahogy leírtuk, vagy di-alfa és di-béta kapcsolt alegységekkel rendelkező hemoglobin is előállítható. Alternatív megoldásként más fúziós típusok is előre láthatók, melyekben az egyik alfa/béta dimer alfa alegysége fuzionál a másik dimer béta alegységéhez (6. Ábra). Ebben, két egyéni, kapcsolt polipeptid dimerizálna egy pszeudo-tetramer hemoglobin létrehozása céljából. Ez a megközelítés azon a tényen alapul, hogy a dimerizáció specifikus azonos alegység párokat

foglal magába, melyekre mint $\alpha 1\beta 1$ és $\alpha 2\beta 2$ -re utalunk.

Ezen alternatív fúziós megközelítésre példa az 1-es dimer alfa alegység C terminális maradéka (Arg 141) fuzionáltatható közvetlenül vagy egy közbeeső fúziós szekvenciával a 2-es dimer béta alegységének C hélix N-terminális aminosavához (Tyr 35). Ez egy új C terminális maradékot hozna létre a béta B hélix végén (Val 34) és a béta A és B hélixeket tartalmazó polipeptid egy részét "szabadon" hagyná (1-34 maradékok, eeket is beleértve). Ezek a változtatások olyan proteint eredményeznének, mely az A-H alfa alegység hélixeket a C-H béta alegység hélixekhez fuzionálva tartalmazná. A béta alegység A és B hélixekből álló polipeptid kovalensen kapcsolódna a proteinhez a molekulába való új hélix beépítésével. A hélixet úgy kell megtervezni, hogy áthidalja a béta C terminus (His 146) és az A hélix eredeti béta N terminusa (Val 1) közötti távolságot. Ezen változtatások után a hélixek szekvenciája az új protein N terminusától a C terminusig a következő lenne: (alfa) A-B-C-E-F'-F-G-H- (béta) -C-D-E-F'-F-G-H- új-A-B. A fúziós régió aktuális elhelyezése nagy gondosságot igényel, hogy a szerkezet új régiói ne nyuljanak be a dimer-dimer interface régióba, ami a kooperativitáshoz kritikus fontosságu. Bázikus vagy savas maradékokat tartalmazó aminosavak a molekulába bizonyos pontokon történő bejuttatása lehetővé teszi a funkcionálisan fontos sóhidak és hidrogén kötések visszaállítását, melyek a normál N és C terminusok manipulálásának eredményeként elveszhettek. A fenti megközelítés kiterjedhet a teljes hemoglobin molekula létrehozására vagy az egyéni dimerek egyedüli polipeptid láncokkénti termelésére, bár ez utóbbi esetben nem várjuk, hogy a dimer képződés ellen stabilizációt biztosít.

A diszulfid kötés képződésre való lehetőség biztosítása céljából egy ciszteint juttathatunk az $\alpha 1\beta 1$ pszeudodimer a vagy

β globin doménjébe.

A referencia Példa: A rekombináns alfa globin és rekombináns béta globin haemmel való újraépítése és kémiai redukciója mesterséges hemoglobin létrehozásához

A következő példában a mesterségesen létrehozott hemoglobin előállításának hagyományos módszerére adunk példát.

A liofilezett rekombináns alfa és béta globinokat (100 mg mindegyikből) egyenként feloldjuk 8M urea/50 mM Tris-Cl (pH 8.01/1 mM EDTA/ 1 mM DTT elegyében 5 mg/ml koncentrációjára higitjuk és szobahőmérsékleten 3-4 órán keresztül inkubáljuk. Az alfa globint ezután 0.3 mg/ml koncentrációjára higitjuk hűtött 20 mM K_2HPO_4 , pH 5.7/1 mM EDTA/1mM DTT elegyével. A hemint (25 mg) feloldjuk 2.4 mg 0.1 M KOH-ban, 1 M KCN azonos térfogatnyi mennyiségével higitjuk; ezt az oldatot tesszük ezután 0.1 mg/ml koncentrációjává heminben és 20 mM K_2HPO_4 (pH6.7) elegyében törzs foszfát pufferben. Az ebből az oldatból származó hemint 2.8 moláris feleslegben adjuk a hűtött alfa-globinhoz; a béta globin azonos moláris mennyiségét adjuk hozzá, és az oldatot 4 °C hőmérsékleten dializáltuk 0.1 M K_2HPO_4 , pH 7.6/1 mM EDTA/ 1 mM KCN elegyével szemben. A mesterséges Hb oldatot ultraszűrővel koncentráltuk PM-10 membránt (Amicon) használva és egy 200 ml-es csavaros tetejű gumi szeptumos teszt csőbe helyeztük. A hemoglobin oldatot eltávolítással és N_2 elárasztással dezoxigenáltuk, majd az oldatot CO-val telítettük. 100 mM nátrium ditionit oldatot készítettünk anaerob módon egy 20 ml-es csavaros tetejű gumi szeptumos teszt csőben. A ditionit 4.5 ekvivalenseit adtuk a Hb

oldathoz injekcióstüvel és az elegyet jégen 15 percig inkubáltuk. A Hb oldatot gélszűrtek 10 mM Na foszfát pufferrel (pH 6.0) szemben egy 4x 40 cm-es Sephadex G-25 (finom) oszlopon. A színes oldatot ezután egy ugyanilyen pufferrel ekvilibrált 2x10 cm-52 (Whatman) oszlopra helyeztük és a kromatográfiát 500 ml 10 mM Na foszfát puffer (pH6.0) és 500 ml 70 mMnátrium foszfát puffer (pH6.9) elegyének lineáris grádiensével futtattuk. A Hb-ből a CO-t fotolizissel távolítottuk el oxigén áram alatt. Az ily módon előállított mesterséges Hgb-t csupán 25 %-os hozamban izoláltuk a fúziós peptidekből, de nativ oxigén kötő tulajdonságokat mutat.

B Referencia Példa: P₅₀ Meghatározás

A tisztított hemoglobin oldatok általunk előnyben részesített P50 meghatározása a csatolt igénypontok céljára a következők szerint történik:

A hemoglobin-oxigén egyensúlyi görbéket Hemox AnalyzerTM-et (TCS Medical Products, Southampton, PA) használva mértük 25 vagy 37 +0.1 °C hőmérsékleten 50 mM HEPES puffer/0.1 M NaCl elegyében (pH 7.4). Az oxigén egyensúlyi görbéket az oxihemoglobin oldat N₂-vel való dezoxigenációjával mértük, mely oldatot korábban vízzel telített O₂-nel (a példához egy P50>10torr) vagy vízzel telített sűrített levegővel ekvilibráltunk. Az abszorbancia leolvasásokat 568 és 558 nm hullámhosszokon a teljes futtatás alatt mértük a mintában levő oxihemoglobin százalékanak meghatározásához. Az oxihemoglobin százaléka egyenesen arányos a log A₅₅₈/log A₅₆₈-cal és független az uthossztól.. Az abszorbanciá-

kat és az oxigén nyomásokat is mintáztuk programozható-gyűjtő-12-bites analóg-digitális konverterrel (Labmaster PGH, Scientific Solutions, Solon, OH) számítógépes vezérlés alatt. Az oxigén egyensúlyi görbét egy alacsony-apss digitális szűrőnek vetettük alá. A P_{50} értékeket (az 50%-os oxigén kötési hely telítéshez szükséges parciális O_2 nyomás) és a Hill koeficienseket (n_{max}) a digitálisan szűrt adatokból számítottuk a laboratóriumunkban kifejlesztett szoftware-t használva. A Hill koeficienseket a $d \log[y/1-y]/d \log p$ függvény maximális meredekségeként határoztuk meg, ahol y a %-os O_2 telítés és p az O_2 parciális nyomása.

A P_{50} más körülmények között is mérhető, de meg kell jegyeznünk, hogy számos környezeti tényező befolyásolja a hemoglobin oxigén affinitását. A pH, CO_2 szervetlen egybeolvadások, szerves foszfátok és a hőmérséklet P_{50} -re kifejtett hatását Bunn és Forget tárgyalják meg, HEMOGLOBIN: MOLECULAR, GENETIC AND CLINICAL ASPECTS 37-47, 95-98 (W.B. Saunders Co., 1986).

Mivel a teljes vér oxigén kötési görbéinek számos meghatározását végezték már el standard fiziológiás körülmények között (37 °C hőmérséklet, pH 7.4, PCO_2 40 mm Hg) szükség lehet az irodalomban található adatok egybevetésre. Ilyen összefüggésben meg kell jegyeznünk, hogy egy 10 °C hőmérséklet emelés majdnem kétszeres növekedést eredményez a P_{50} értékben, míg a P_{50} pH függősége kb a következőként adható meg: $\Delta \log P_{50} / \Delta pH = -0.5$.

A tisztított Hb készítmények P_{50} értékeinek a teljes vér P_{50} értékeivel való összehasonlítása problémás lehet. A teljes vér vagy az izolált RBCk számos olyan alkotórészt tartalmaznak melyek természetesen módosítják a hemoglobin-oxigén kötési görbét. Az RBC bezárja a Hgb-t a 2.3-DPG effektor molekula magas koncentrá-

ciójának jelenlétében; ez egy olyan molekula, mely a Hgb-t jelentősen alacsonyabb O_2 affinitásra készíti. Más intra-erithrocita alkotók szintén hatással vannak a kötési görbe alakjára: ATP, Cl^- , CO_2 , H^+ , ortofoszfát, methemoglobin és karboxihemoglobin. Ezen anyagok szintjei a kortól a nemtől és az egészségi állapottól is függhetnek. Ezek az anyagok normálisan nincsenek jelen a tisztított Hgb oldatokban és ezért a tisztított Hgb P_{50} értéke alacsonyabb mint a teljes vér esetében talált érték. A Hgb-oxigén affinitás egy nagyon fontos módosítója a Cl^- ion. A Cl^- ion az erithrocitán kívül, a vér szérumban található megközelítően 0.15 M fiziológiás koncentrációban. Mivel a Cl^- alacsony O_2 affinitást okoz, egy in vitro mért P_{50} értékkel rendelkező Hgb oldat sokkal alacsonyabb O_2 affinitással rendelkezhet ha a véráramba juttatjuk. A teljes vér oxigén kötésének mérésekor felmerülő másik probléma az, hogy az RBC-k meglehetősen törékenyek és az erithrocita az oxigén kötés mérésére használt műszerbe való bejuttatása során elkerülhetetlen, hogy az RBC-k egy kis százaléka lizáljon. A lizált RBC-k Hgbt juttatnak a környező tápközegbe a 2,3-DPG-től távol, így mivel a szabad Hgb magasabb affinitással rendelkezik mint az intraerithrocita Hgb, a lizált RBC-k magasabb O_2 affinitást mutatnak és így hamisan alacsony P_{50} értéket mutatnak a teljes vér P_{50} meghatározásakor. Széleskörűen elfogadott, hogy fiziológiás körülmények között a teljes vér P_{50} értéke 26-28 mm Hg. Ha a Hgb-t azonban a teljes vérből izoláltuk a mért P_{50} érték az 1-10 mmHg nagyságrendbe esik a vizsgálatot végzők kísérleti körülményeitől függően. Ezen okok miatt a legfontosabb a Hgb-oxigén egyensúly mérését tisztított Hgb molekulákkal végezni szigorú puffer, pH és só koncentrációk körülményei között. Sajnos, nincs az összes kutató által elfogadott "standard" a Hgb oxigén kötés in vitro rendszerekben való méréséhez.

Mégis, mivel sok mutáns hemoglobint először betegek teljes véréből azonosították, igény lenne a natív és a mutáns Hgb O₂ iránti relatív affinitásának összehasonlítására, a teljes vér és a tisztított Hgb készítmény között. Erre példa a Hgb Chico (béta lys⁶⁶-thr). Ha valaki a tisztított mutáns Hgb csupán P₅₀ értékét vizsgálja (10.1 mmHg) meg kell említeni, hogy a Hgb alacsonyabb P₅₀ értékkel rendelkezik, mint a normál teljes vér (27.2 mmHg). Ha azt a hemoglobint RBC-kben mérjük fiziológiai körülmények között nyilvánvaló, hogy magasabb P₅₀ értékkel rendelkezik mint a normál teljes vér (38 mmHg). Nem lehet megjósolni, hogy milyen mértékben fog megváltozni a P₅₀ érték a teljes vér Chicoból tisztított Hgb Chicoba való változástól ha vérpótlóként a véráramba juttatjuk. Azonban levonhatjuk azt a következtetést, hogy a P₅₀ érték magasabb lesz mint tiszta formájában, valamint azt, hogy a mutáns Hgb szerves foszfátokkal való reagáltatása még magasabb P₅₀ értéket eredményez.

SZEKVENCIA LISTA

(1) ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ:

(i) FELTALÁLÓ: ANDERSON, DAVID C.

MATHEWS, ANTONY JAMES

STETLER, GARY L.

(ii) A TALÁLmány Címe: MULTIMER HEMOGLOBINOK TERMELESE ÉS
ALKALMAZÁSA

(iii) A SZEKVENCIÁK SZÁMA: 28

(iv) LEVELEZÉSI Cím:

(A) Címzett: Browdy and Neimark

(B) UTCA: 419 Seventh Street, N.W. Suite 300

(C) VÁROS: Washington

(D) ÁLLAM: D.C.

(E) ORSZÁG: USA

(F) IRÁNYÍTÓSZÁM: 20004

(v) SZÁMITÓGÉPES OLVASÁSI FORMA:

(A) A HORDOZÓ TIPUSA: Floppy lemez

(B) SZÁMITÓGÉP: IBM PC kompatibilis

(C) OPERÁCIÓS RENDSZER: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, #1.25 verzió

(vi) A JELEN TALÁLMÁNY ADATAI:

(A) A TALÁLMÁNY SZÁMA: EP PCT/US92/09752

(B) AZ IKTATÁS DÁTUMA: 1992 november 6.

(C) MINŐSÍTÉS:

(viii) AZ ÜGYVÉD/IRODA ADATAI:

(A) NÉV: COOPER, IVER P

(B) REGISZTRÁCIÓS SZÁM: 28,005

(C) REFERENCIA/DOKUNABTUM SZÁMA: ANDERSON-6-PCT

(ix) TELEKOMMUNIKÁCIÓS ADATOK:

(A) TELEFON: 202-628-5197

(B) TELEFAX: 202-737-3528

(C) TELEX: 248633

(2) AZ 1. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 1464 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

GAATTCGAGC TCGGTACCCG GGCTACATGG AGATTAAGTC AATCTAGAGG GTATTAATAA

60

TGTATCGCTT AAATAAGGAG GAATAACATA TGCTGTCTCC GGCCGATAAA ACCAACGTTA

120

AAGCTG

GGGTAAAGTT GCGCGCACG CTGGTGAATA CCGTGCTGAA GCTCTCGAGC

180

GSTATGTTCTT GTCTTTCCCG ACCACCAAAA CCTACTTCCC GCACTTCGAC CTGTCTCAGC

240

GTTCTGCGCA GGTAAAGGT CACGGTAAAA AAGTTGCTGA TGCTCTGACC AACGCTGTTG

300

CTCACGTTGA TGATATGCCG AACGCGTTGT CTGCTCTGTC TGATCTGCAC GCTCACAAAC

360

TGCGTGTTGA TCCGGTTAAC TTCAAAGTGC TGTCTCACTG CCTGCTGGTT ACTCTGGCTG

420

CTCATCTGCC GGCTGAATTT ACCCCGGCTG TTCATGCGTC TCTGGATAAA TTCCTGGCTT

480

CTGTTTCTAC CGTTCTGACT TCGAAATACC GTGGTGTTCT GTCTCCGGCC GATAAAACCA

540

ACGTAAAGC TGCTTGGGGT AAAGTTGGCG CGCACGCTGG TGAATACGGT GCTGAAGCTC

600

TCGAGCGTAT GTTCCTGTCT TTCCCGACCA CCAAAACCTA CTTCCCGCAC TTCGACCTGT

660

CTCACGGTTC TGCGCAGGTT AAAGGTCACG GTAAAAAAGT TGCTGATGCT CTGACCAACG

720

CTGTTGCTCA CGTTGATGAT ATGCCGAACG CGTTGTCTGC TCTGTCTGAT CTGCACGCTC

780

ACAAACTGCG TGTTGATCCG GTTAACTTCA AACTGCTGTC TCACTGCCTG CTGGTTACTC

840

TGGCTGCTCA TCTGCCGGCT GAATTTACCC CGGCTGTTCA TCGTCTCTG GATAAATTCC
900
TGGCTTCTGT TTCTACCGTT CTGACTTCGA AATACCGTTA ATGACTGCAG CTACATGGAG
960
ATTA ACTCAA TCTAGAGGGT ATTAATAATG TATCGCTTAA ATAAGGAGGA ATAACATATG
1020
CACCTGACTC CGGAAGAAAA ATCCGCGGTT ACTGCTCTGT GGGGTAAAGT GAACGTTGAC
1080
GAAGTTGGTG GTGAAGCTCT GGGACGTCTG CTGGTTGTTT ACCCGTGGAC TCAGCGTTTC
1140
TTTGAATCTT TCGGAGATCT GTCTACCCCG GACGCTGTTA TGGGTAACCC GAAAGTTAAA
1200
GCCCCATGGTA AAAAAGTTCT GGGTGCTTTC TCTGACGGTC TGGCTCACCT GGACAACCTG
1260
AAAGGTACCT TCGCTACTCT GTCTGAGCTC CACTGCGACA AACTGCACGT TGACCCGGAA
1320
AACTTCCGTC TGCTGGGTAA AGTACTAGTT TCGGTTCTGG CTCACCACTT CGGTAAAGAA
1380
TTC ACTCCGC CGGTT CAGGC TGCTTACCAG AAAGTTGTTG CTGGTGTTGC TAACGCGCTA
1440
GCTCACA AAT ACCACTAATG AAGC
1464

(2) A 2. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 4 aminosav

(B) TIPUS: aminosav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 2. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Ile Glu Gly Arg

1

(2) A 3. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 5 aminosav

(B) TIPUS: aminosav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 3. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Val His Leu Thr Pro

1

5

(2) A 4. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 4 aminosav

(B) TIPUS: aminosav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 4. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Ser Lys Tyr Arg

1

(2) AZ 5. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 4 aminosav

(B) TIPUS: aminosav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) AZ 5. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Val Leu Ser Pro

1

(2) A 6. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 4 aminosav

(B) TIPUS: aminosav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 6. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

His Lys Tyr His

1

(2) A 7. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 4 aminosav

(B) TIPUS: aminosav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 7. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Val His Leu Thr

1

(2) A 8. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 37 aminosav

(B) TIPUS: aminosav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 8. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Lys	Cys	Ala	Glu	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu
1				5				10						15	
Glu	Ala	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Glu	Ala
			20					25					30		
Leu	Glu	Gly	Lys	Leu											
															35

(2) A 9. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 16 aminosav

(B) TIPUS: aminosav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 9. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Gly Glu Leu Glu Glu Leu Leu Lys Lys Leu Lys Glu Leu Leu Lys Gly
 1 5 10 15

(2) A 10. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 10 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: DNS

(xi) A 10. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

GAAGCCAUGG

10

(2) A 11. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 4 aminosav

(B) TIPUS: aminosav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 11. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Ile Glu Gly Arg

1

(2) A 12. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 31 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: DNS

(xi) A 12. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

GCGGCCGCGG AAGAGTCAAT TCAGGAGGGT G

31

(2) A 13. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 33 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: DNS

(xi) A 13. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

GCCGGCCGTC ACTGCCCGCT TTCCAGTCGG GAA

33

(2) A 14. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 27 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: DNS

(xi) A 14. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

CCGAACGCGT TGTGCGCTCT GTCTGAT

27

(2) A 15. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 30 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: DNS

(xi) A 15. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

GGTGCTCACG TTGATTGCAT GCCGAACGCG

30

(2) A 16. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 30 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: DNS

(xi) A 16. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

CTGACCAACG CTGTTTGCCA CGTTGATGAT

30

(2) A 17. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 141 aminosav

(B) TIPUS: aminosav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 17. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Val	Leu	Ser	Pro	Ala	Asp	Lys	Thr	Asn	Val	Lys	Ala	Ala	Trp	Gly	Lys
1				5					10					15	
Val	Gly	Ala	His	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Met
			20					25					30		
Phe	Leu	Ser	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Pro	His	Phe	Asp	Leu
			35				40					45			
Ser	His	Gly	Ser	Ala	Gln	Val	Lys	Gly	His	Gly	Lys	Lys	Val	Ala	Asp
	50					55				60					
Ala	Leu	Thr	Asn	Ala	Val	Ala	His	Val	Asp	Asp	Met	Pro	Asn	Ala	Leu
65					70					75				80	
Ser	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	His	Ala	His	Lys	Leu	Arg	Val	Asp	Pro	Val
				85					90				95		
Asn	Phe	Lys	Leu	Leu	Ser	His	Cys	Leu	Leu	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	His
				100					105				110		
Leu	Pro	Ala	Glu	Phe	Thr	Pro	Ala	Val	His	Ala	Ser	Leu	Asp	Lys	Phe
			115					120				125			
Leu	Ala	Ser	Val	Ser	Thr	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr	Arg			
			130				135					140			

(2) A 18. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 141 aminosav

(B) TIPUS: aminosav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 18. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Ser	Leu	Thr	Lys	Thr	Glu	Arg	Thr	Ile	Ile	Val	Ser	Met	Trp	Ala	Lys
1				5					10					15	
Ile	Ser	Thr	Gln	Ala	Asp	Thr	Ile	Gly	Thr	Glu	Thr	Leu	Glu	Arg	Leu
			20					25					30		
Phe	Leu	Ser	His	Pro	Gln	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Pro	His	Phe	Asp	Leu
		35					40					45			
His	Pro	Gly	Ser	Ala	Gln	Leu	Arg	Ala	His	Gly	Ser	Lys	Val	Val	Ala
	50					55				60					
Ala	Val	Gly	Asp	Ala	Val	Lys	Ser	Ile	Asp	Asp	Ile	Gly	Gly	Ala	Leu
65					70				75					80	
Ser	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Ala	Tyr	Ile	Leu	Arg	Val	Asp	Pro	Val
				85					90					95	
Asn	Phe	Lys	Leu	Leu	Ser	His	Cys	Leu	Leu	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	Arg
			100					105					110		
Phe	Pro	Ala	Asp	Phe	Thr	Ala	Glu	Ala	His	Ala	Ala	Trp	Asp	Lys	Phe
		115					120					125			
Leu	Ser	Val	Val	Ser	Ser	Val	Leu	Thr	Glu	Lys	Tyr	Arg			
	130						135				140				

(2) A 19. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZUSÁG: 146 aminosav
- (B) TIPUS: aminosav
- (C) SZÁLTIPUS: egyszálú
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 19. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp Gly

```

1           5           10           15
Lys Val Asn Val Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu Leu
           20           25           30
Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp Leu
           35           40           45
Ser Thr Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His Gly
           50           55           60
Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp Asn
65           70           75           80
Leu Lys Gly Thr Phe Ala Thr Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys Leu
           85           90           95
His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val Cys

           100           105           110
Val Leu Ala His His Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Pro Val Gln Ala
           115           120           125
Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His Lys
           130           135           140
Tyr His
145

```

(2) A 20. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZUSÁG: 146 aminosav
- (B) TIPUS: aminosav
- (C) SZÁLTIPUS: egyszálú
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 20. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

```

Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Thr Ala Val Asn Ala Leu Trp Gly
1           5           10           15
Lys Val Asn Val Asp Ala Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu Leu
           20           25           30
Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp Leu
           35           40           45
Ser Ser Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His Gly
           50           55           60
Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp Asn
65           70           75           80
Leu Lys Gly Thr Phe Ser Gln Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys Leu
           85           90           95
His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val Cys
           100           105           110
Val Leu Ala Arg Asn Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Gln Met Gln Ala
           115           120           125
Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His Lys
           130           135           140
Tyr His
145

```

(2) A 21. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZUSÁG: 146 aminosav
- (B) TIPUS: aminosav
- (C) SZÁLTIPUS: egyszálú
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 22. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Gly	His	Phe	Thr	Glu	Glu	Asp	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly
1				5					10					15	
Lys	Val	Asn	Val	Glu	Asp	Ala	Gly	Gly	Glu	Thr	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu
				20				25					30		
Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Asp	Ser	Phe	Gly	Asn	Leu
				35			40					45			
Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	Ile	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly
	50					55					60				
Lys	Lys	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Gly	Asp	Ala	Ile	Lys	His	Leu	Asp	Asp
65					70					75				80	
Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Gln	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu
				85				90					95		
His	Val	Asp	Pro	Glu	Asn	Phe	Lys	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Thr
				100				105					110		
Val	Leu	Ala	Ile	His	Phe	Gly	Lys	Glu	Phe	Thr	Pro	Glu	Val	Gln	Ala
				115				120					125		
Ser	Trp	Gln	Lys	Met	Val	Thr	Gly	Val	Ala	Ser	Ala	Leu	Ser	Ser	Arg
	130						135					140			
Tyr	His														
145															

(2) A 23. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZUSÁG: 146 aminosav
- (B) TIPUS: aminosav
- (C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 22. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Gly	His	Phe	Thr	Glu	Glu	Asp	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly
1				5					10					15	
Lys	Val	Asn	Val	Glu	Asp	Ala	Gly	Gly	Glu	Thr	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu
				20				25					30		
Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Asp	Ser	Phe	Gly	Asn	Leu
		35					40					45			
Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	Ile	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly
		50				55					60				
Lys	Lys	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Gly	Asp	Ala	Thr	Lys	His	Leu	Asp	Asp
65				70					75					80	
Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Gln	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu
				85					90				95		
His	Val	Asp	Pro	Glu	Asn	Phe	Lys	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Thr
				100					105				110		
Val	Leu	Ala	Ile	His	Phe	Gly	Lys	Glu	Phe	Thr	Pro	Glu	Val	Gln	Ala
				115					120				125		
Ser	Trp	Gln	Lys	Met	Val	Thr	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Leu	Ser	Ser	Arg
				130			135					140			
Tyr	His														
145															

(2) A 24. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 146 aminosav

(B) TIPUS: aminosav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 24. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Val	His	Phe	Thr	Ala	Glu	Glu	Lys	Ala	Ala	Val	Thr	Ser	Leu	Trp	Ser
1				5				10					15		
Lys	Met	Asn	Val	Glu	Glu	Ala	Gly	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu
				20				25					30		
Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Asp	Ser	Phe	Gly	Asn	Leu
		35					40					45			
Ser	Ser	Pro	Ser	Ala	Ile	Leu	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly
		50				55					60				
Lys	Lys	Val	Leu	Thr	Ser	Phe	Gly	Asp	Ala	Ile	Lys	Asn	Met	Asp	Asn
65				70					75					80	
Leu	Lys	Pro	Ala	Phe	Ala	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu
				85					90					95	
His	Val	Asp	Pro	Glu	Asn	Phe	Lys	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	Met	Val	Ile
				100					105					110	
Ile	Leu	Ala	Thr	His	Phe	Gly	Lys	Glu	Phe	Thr	Pro	Glu	Val	Gln	Ala
				115					120				125		
Ala	Trp	Gln	Lys	Leu	Val	Ser	Ala	Val	Ala	Ile	Ala	Leu	Ala	His	Lys
				130				135					140		
Tyr	His														
145															

(2) A 25. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 8 aminosav

(B) TIPUS: aminosav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 25. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Met Tyr Arg Leu Asn Lys Glu Glu

1

5

(2) A 26. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZUSÁG: 141 aminosav

(B) TIPUS: aminosav

(C) SZÁLTIPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 26. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Met Leu Ser Pro Ala Asp Lys Thr Asn Val Lys Ala Ala Trp Gly Lys

1

5

10

15

Val Gly Ala His Ala Gly Glu Tyr Gly Ala Glu Ala Leu Glu Arg Met

20

25

30

Phe Leu Ser Phe Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Pro His Phe Asp Leu

35

40

45

Ser His Gly Ser Ala Gln Val Lys Gly His Gly Lys Lys Val Ala Asp

50

55

60

Ala Leu Thr Asn Ala Val Ala His Val Asp Asp Met Pro Asn Ala Leu

65

70

75

80

Ser Ala Leu Ser Asp Leu His Ala His Lys Leu Arg Val Asp Pro Val

85

90

95

Val	Leu	Ser	Pro	Ala	Asp	Lys	Thr	Asn	Val	Lys	Ala	Ala	Trp	Gly	Lys
1				5					10					15	
Val	Gly	Ala	His	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Met
			20					25					30		
Phe	Leu	Ser	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Pro	His	Phe	Asp	Leu
		35					40					45			
Ser	His	Gly	Ser	Ala	Gln	Val	Lys	Gly	His	Gly	Lys	Lys	Val	Ala	Asp
	50					55					60				
Ala	Leu	Thr	Asn	Ala	Val	Ala	His	Val	Asp	Asp	Met	Pro	Asn	Ala	Leu
65					70					75					80
Ser	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	His	Ala	His	Lys	Leu	Arg	Val	Asp	Pro	Val
				85					90					95	
Asn	Phe	Lys	Leu	Leu	Ser	His	Cys	Leu	Leu	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	His

	100		105		110										
Leu	Pro	Ala	Glu	Phe	Thr	Pro	Ala	Val	His	Ala	Ser	Leu	Asp	Lys	Phe
	115		120		125										
Leu	Ala	Ser	Val	Ser	Thr	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr	Arg			
	130		135		140										

(2) A 28. SZÁMU SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZUSÁG: 146 aminosav
- (B) TIPUS: aminosav
- (C) SZÁLTIPUS: egyszálú
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) A 28. SZÁMU SZEKVENCIA LEIRÁSA:

Met	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr	Ala	Leu	Trp	Gly
1				5				10					15		
Lys	Val	Asn	Val	Asp	Glu	Val	Gly	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu
				20				25					30		
Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Glu	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu
				35				40					45		
Ser	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly
	50						55					60			
Lys	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	His	Leu	Asp	Asn
65				70				75					80		
Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Thr	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu
				85				90					95		
His	Val	Asp	Pro	Glu	Asn	Phe	Arg	Leu	Leu	Gly	Lys	Val	Leu	Val	Cys
				100				105					110		

Val Leu Ala His His Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Pro Val Gln Ala

115

120

125

Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His Lys

130

135

140

Tyr His

145

1. TÁBLÁZAT A HUMÁN GLOBIN ALEGYSÉGEK ELSŐDLEGES SZERKEZETE

Helix	α	Zeta	Helix*	β	δ	Gamma	ϵ
NA1	1 Val	Ser	NA1	1 Val	Val	Gly	Val
			NA2	2 His	His	His	His
NA2	2 Leu	Leu	NA3	3 Leu	Leu	Phe	Phe
A1	3 Ser	Thr	A1	4 Thr	Thr	Thr	Thr
A2	4 Pro	Lys	A2	5 Pro	Pro	Glu	Ala
A3	5 Ala	Thr	A3	6 Glu	Glu	Glu	Glu
A4	6 Asp	Glu	A4	7 Glu	Glu	Asp	Glu
A5	7 Lys	Arg	A5	8 Lys	Lys	Lys	Lys
A6	8 Thr	Thr	A6	9 Ser	Thr	Ala	Ala
A7	9 Asn	Ile	A7	10 Ala	Ala	Thr	Ala
A8	10 Val	Ile	A8	11 Val	Val	Ile	Val
A9	11 Lys	Val	A9	12 Thr	Asn	Thr	Thr
A10	12 Ala	Ser	A10	13 Ala	Ala	Ser	Ser
A11	13 Ala	Met	A11	14 Leu	Leu	Leu	Leu
A12	14 Trp	Trp	A12	15 Trp	Trp	Trp	Trp
A13	15 Gly	Ala	A13	16 Gly	Gly	Gly	Ser
A14	16 Lys	Lys	A14	17 Lys	Lys	Lys	Lys

4. T Á B L Á Z A T

(folytatás)

CE1	37 Pro	Pro	CD1	36 Pro	Pro	Pro	Pro
CE2	38 Thr	Gln	CD2	37 Trp	Trp	Trp	Trp
CE3	39 Thr	Thr	CD3	38 Thr	Thr	Thr	Thr
CE4	40 Lys	Lys	CD4	39 Gln	Gln	Gln	Gln
	41 Thr	Thr	CD5	40 Arg	Arg	Arg	Arg
	42 Tyr	Tyr	CD6	41 Phe	Phe	Phe	Phe
	43 Phe	Phe	CD7	42 Phe	Phe	Phe	Phe
	44 Pro	Pro	CD8	43 Glu	Glu	Asp	Asp
	45 His	His	D1	44 Ser	Ser	Ser	Ser
	46 Phe	Phe	D2	45 Phe	Phe	Phe	Phe
CE5			D3	46 Gly	Gly	Gly	Gly
CE6	47 Asp	Asp	D4	47 Asp	Asp	Asn	Asn
CE7	48 Leu	Leu	D5	48 Leu	Leu	Leu	Leu
CE8	49 Ser	His	D6	49 Ser	Ser	Ser	Ser
	50 His	Pro		50 Thr	Ser	Ser	Ser
				51 Pro	Pro	Pro	Pro
				52 Asp	Asp	Ser	Ser
				53 Ala	Ala	Ala	Ala
				54 Val	Val	Ile	Ile
				55 Met	Met	Met	Leu

1. T Á B L Á Z A T

(folytatás)

CE9	51 Gly	Gly	D7	56 Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
E1	52 Ser	Ser	E1	57 Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn
E2	53 Ala	Ala	E2	58 Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
E3	54 Gln	Gln	E3	59 Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
E4	55 Val	Leu	E4	60 Val	Val	Val	Val	Val	Val
E5	56 Lys	Arg	E5	61 Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
E6	57 Gly	Ala	E6	62 Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
E7	58 His	His	E7	63 His	His	His	His	His	His
E8	59 Gly	Gly	E8	64 Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
E9	60 Lys	Ser	E9	65 Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
E10	61 Lys	Lys	E10	66 Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
E11	62 Val	Val	E11	67 Val	Val	Val	Val	Val	Val
E12	63 Ala	Val	E12	68 Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
E13	64 Asp	Ala	E13	69 Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	Thr
E14	65 Ala	Ala	E14	70 Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser
E15	66 Leu	Val	E15	71 Phe	Phe	Phe	Leu	Phe	Phe
E16	66 Thr	Gly	E16	72 Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly
E17	68 Asn	Asp	E17	73 Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
E18	69 Ala	Ala	E18	74 Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala
E19	70 Val	Val	E19	75 Leu	Leu	Leu	Ile, Thr	Ile	Ile

1. T Á B L Á Z A T

E20	71 Ala	Lys	E20	(folytatás)	76 Ala	Ala	Lys	Lys
EF1	72 His	Ser	EF1		77 His	His	His	Asn
EF2	73 Val	Ile	EF2		78 Leu	Leu	Leu	Met
EF3	74 Asp	Asp	EF3		79 Asp	Asp	Asp	Asp
EF4	75 Asp	Asp	EF4		80 Asn	Asn	Asp	Asn
EF5	76 Met	Ile	EF5		81 Leu	Leu	Leu	Leu
EF6	77 Pro	Gly	EF6		82 Lys	Lys	Lys	Lys
EF7	78 Asn	Gly	EF7		83 Gly	Gly	Gly	Pro
EF8	79 Ala	Ala	EF8		84 Thr	Thr	Thr	Ala
F1	80 Leu	Leu	F1		85 Phe	Phe	Phe	Phe
F2	81 Ser	Ser	F2		86 Ala	Ser	Ala	Ala
F3	82 Ala	Lys	F3		87 Thr	Gln	Gln	Lys
F4	83 Leu	Leu	F4		88 Leu	Leu	Leu	Leu
F5	84 Ser	Ser	F5		89 Ser	Ser	Ser	Ser
F6	85 Asp	Glu	F6		90 Glu	Glu	Glu	Glu
F7	86 Leu	Leu	F7		91 Leu	Leu	Leu	Leu
F8	87 His	His	F8		92 His	His	His	His
F9	88 Ala	Ala	F9		93 Cys	Cys	Cys	Cys
FG1	89 His	Tyr	FG1		94 Asp	Asp	Asp	Asp
FG2	90 Lys	Ile	FG2		95 Lys	Lys	Lys	Lys

1. T Á B L Á Z A T

(folytatás)

FG3	91 Leu	Leu	FG3	96 Leu	Leu	Leu	Leu
FG4	92 Arg	Arg	FG4	97 His	His	His	His
FG5	93 Val	Val	FG5	98 Val	Val	Val	Val
G1	94 Asp	Asp	G1	99 Asp	Asp	Asp	Asp
G2	95 Pro	Pro	G2	100 Pro	Pro	Pro	Pro
G3	96 Val	Val	G3	101 Glu	Glu	Glu	Glu
G4	97 Asn	Asn	G4	102 Asn	Asn	Asn	Asn
G5	98 Phe	Phe	G5	103 Phe	Phe	Phe	Phe
G6	99 Lys	Lys	G6	104 Arg	Arg	Lys	Lys
G7	100 Leu	Leu	G7	105 Leu	Leu	Leu	Leu
G8	101 Leu	Leu	G8	106 Leu	Leu	Leu	Leu
G9	102 Ser	Ser	G9	107 Gly	Gly	Gly	Gly
G10	103 His	His	G10	108 Asn	Asn	Asn	Asn
G11	104 Cys	Cys	G11	109 Val	Val	Val	Val
G12	105 Leu	Leu	G12	110 Leu	Leu	Leu	Met
G13	106 Leu	Leu	G13	111 Val	Val	Val	Val
G14	107 Val	Val	G14	112 Cys	Cys	Thr	Ile
G15	108 Thr	Thr	G15	113 Val	Val	Val	Ile
G16	109 Leu	Leu	G16	114 Leu	Leu	Leu	Leu
G17	110 Ala	Ala	G17	115 Ala	Ala	Ala	Ala

A. T Á B L Á Z A T

(folytatás)

G18	111 Ala Ala	G18	116 His Arg	Ile	Thr
G19	112 His Arg	G19	117 His Asn	His	His
GH1	113 Leu Phe	GH1	118 Phe Phe	Phe	Phe
GH2	114 Pro Pro	GH2	119 Gly Gly	Gly	Gly
GH3	115 Ala Ala	GH3	120 Lys Lys	Lys	Lys
GH4	116 Glu Asp	GH4	121 Glu Glu	Glu	Glu
GH5	117 Phe Phe	GH5	122 Phe Phe	Phe	Phe
H1	118 Thr Thr	H1	123 Thr Thr	Thr	Thr
H2	119 Pro Ala	H2	124 Pro Pro	Pro	Pro
H3	120 Ala Glu	H3	125 Pro Gln	Glu	Glu
H4	121 Val Ala	H4	126 Val Met	Val	Val
H5	122 His His	H5	127 Gln Gln	Gln	Gln
H6	123 Ala Ala	H6	128 Ala Ala	Ala	Ala
H7	124 Ser Ala	H7	129 Ala Ala	Ser	Ala
H8	125 Leu Trp	H8	130 Tyr Tyr	Trp	Trp
H9	126 Asp Asp	H10	131 Gln Gln	Gln	Gln
10	127 Lys Lys	H10	132 Lys Lys	Lys	Lys
H11	128 Phe Phe	H11	133 Val Val	Met	Leu
H12	129 Leu Leu	H12	134 Val Val	Val	Val

1. T Á B L Á Z A T

(folytatás)

H13	130 Ala	Ser	H13	135 Ala	Ala	Thr	Ser
H14	131 Ser	Val	H14	136 Gly	Gly	Gly, Ala	Ala
H15	132 Val	Val	H15	137 Val	Val	Val	Val
H16	133 Ser	Ser	H16	138 Ala	Ala	Ala	Ala
H17	134 Thr	Ser	H17	139 Asn	Asn	Ser	Ile
H18	135 Val	Val	H18	140 Ala	Ala	Ala	Ala
H19	136 Leu	Leu	H19	141 Leu	Leu	Leu	Leu
H20	137 Thr	Thr	H20	142 Ala	Ala	Ser	Ala
H21	138 Ser	Glu	H21	143 His	His	Ser	His
HC1	139 Lys	Lys	HC1	144 Lys	Lys	Arg	Lys
HC2	140 Tyr	Tyr	HC2	145 Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
HC3	141 Arg	Arg	HC3	146 His	His	His	His
-(	1. SZ.SZ.) (18. SZ.SZ.)			(19. SZ.SZ.)	(20. SZ.SZ.)	(21. SZ. SZ.)	(22. SZ. SZ.)

SZ.SZ. = számú szekvencia

30903

A 5x5 grid of dots forming the letters 'MATHS'. The letters are constructed using black dots on a white background. The 'M' is formed by dots at (1,1), (1,2), (1,3), (1,4), (1,5), (2,1), (2,2), (2,3), (2,4), (2,5), (3,1), (3,2), (3,3), (3,4), (3,5), (4,1), (4,2), (4,3), (4,4), (4,5), and (5,1). The 'A' is formed by dots at (1,2), (1,3), (1,4), (1,5), (2,2), (2,3), (2,4), (2,5), (3,2), (3,3), (3,4), (3,5), (4,2), (4,3), (4,4), (4,5), and (5,2). The 'T' is formed by dots at (1,3), (1,4), (1,5), (2,3), (2,4), (2,5), (3,3), (3,4), (3,5), (4,3), (4,4), (4,5), and (5,3). The 'H' is formed by dots at (1,3), (1,4), (1,5), (2,3), (2,4), (2,5), (3,3), (3,4), (3,5), (4,3), (4,4), (4,5), and (5,3). The 'S' is formed by dots at (1,4), (1,5), (2,4), (2,5), (3,4), (3,5), (4,4), (4,5), and (5,4).

139

2 . T Á B L Á Z A T

(folytatás)

Okaloosa	48(CD7)	leu-->arg	0.95(0.7)	30(26)	C-D helices	16
Bologna	61(E5)	lys-->met		37.6 (27.0)	B-E helices	17
Cairo	65(E9)	lys-->gln		41(31)	heme	18
Chico	66(E10)	lys-->thr	10.1(5.0)	38.0 (27.2)	heme	19
Bristol	67(E11)	val-->asp		25.0 (19.0)	heme	20
Seattle	70(E14)	ala-->asp		43.5 (28.1)	heme	21,22
Vancouver	73(E17)	asp-->tyr	n/a			1,23
Korle-Bu	73(E17)	asp-->asn	n/a			1,24
Mobile	73(E17)	asp-->val	n/a			
Rahere	82(EF6)	lys-->thr	15.5(11.0)		DPG site	26
Pyrgos	83(EF7)	gly-->asp			External	27
Roseau-Pointe	90(F6)	glu-->gly		38(28)	$\alpha_1\beta_2$	28
Agenogi	90(F6)	glu-->lys	9.0(6.8)		$\alpha_1\beta_2$	29
Caribbean	91(F7)	leu-->arg	28.0(21.0)		heme	30
Kansas	102(G4)	asn-->thr	28.0(9.0)		$\alpha_1\beta_2$	31

2000

2.. T Á B L Á Z A T

(folytatás)

Beth Israel	102(G4) asn-->ser	88.0 (26.0)	$\alpha_1\beta_2$	32
Saint Mande	102(G4) asn-->tyr	52 (28)	$\alpha_1\beta_2$	33
Richmond	102(G4) asn-->lys	n/a	$\alpha_1\beta_2$	1, 34
Burke	107(G9) gly-->arg	9.3 (7.7)	heme	35
Yoshizuka	108(G10) asn-->asp	12.9 (9.0)	$\alpha_1\beta_1$	36
Presbyterian	108(G10) asn-->lys	6.3 (2.5)	$\alpha_1\beta_1$	37
Peterborough	111(G13) val-->phe	14.0 (9.0)	$\alpha_1\beta_1$	38
New York	113(G15) val-->glu	n/a	G-helix	1, 39
Hope	136(H14) gly-->asp	n/a	heme	1, 40
Himeji	140(H18) ala-->asp	5.8 (4.5)		

* A zárójelben levő értékek a vizsgálók mért P_{50} értékei a hagyományos Hgb A

esetében RBC-mentes vagy RBC-kötött állapotban, ahogy jelöltük

3333

A 2. Táblázat hivatkozásai

- 1) Hemoglobin 1987, 11, 241-308.
- 2) Ohba, Y.; Miyaji, T.; Matsuoka, M.; Yokoyama, M.; Numakura, H.; Nagata, K.; Takebe, Y.; Izumu, Y.; Shibata, S. Biochemi. Biophys. Acta 1975, 405, 155-160.
- 3) Beretta, A.; Prato, V.; Gallo, E.; Lehmann, H. Nature 1968, 217, 1016-1018.
- 4) Knuth, A.; Pribilla, W.; Marti, H.R.; Winterhalter, K.H. Acta Haematol 1979, 61, 121-124.
- 5) Schneider, R.G.; Atkins, R.J.; Hosty, T.S.; Tomlin, G.; Casey, R.; Lehmann, H.; Lorkin, P.A.; Nagei, K. Biochem Biophys. Acta 1975, 400, 365-373.
- 6) Moo-Penn, W.F.; Bechtel, K.C.; Schmidt, R.M.; Johnson, M.H.; Jue, D.L.; Schmidt, D.E.; Dunlap, W.M.; Opella, S.J.; Boneventura, J.; Boneventura, C. Biochemistry 1977, 16, 4872-4879.
- 7) Moo-Penn, W.F.; McPhedran, P.; Bobrow, S.; Johnson, M.H.; Jue, D.L.; Olsen, K.W. Amer. J. Hematol 1981, 11, 137-145.
- 8) Idelson, L.I.; Didkowsky, N.A.; Casey, R.; Lorkin, P.A.; Lehmann, H. Nature 1974, 249, 768-770.
- 9) Gacon, G.; Belkhodja, O.; Wajcman, H.; Labie, D. Febs Lett 1977, 82, 243-246.
- 10) Blouquit.; Delanoe, -Garin, J.; Lacombe, C.; Arous, N.; Cayre, Y.; Peduzzi, J.;

- Braconnier, F.; Galacteros, F.; Febs Lett. 1984, 172, 155-158.
- 11) Dacie, J.V.; Shinton, N.K.; Gaffney, P.J.; Carrell, R.W.; Lehmann, H. Nature 1967, 216, 663-665.
- 12) Keeling, M.M.; Ogden, L.L.; Wrightstone, R.N.; Wilson, J.B.; Reynolds, C.A.; Kitchens, J.L.; Huisman, T.H. J. Clin. Invest. 1971, 50, 2395-2402.
- 13) Bratu, V.; Larkin, P.A.; Lehmann, H.; Predescu, C. Biochem. Biophys. Acta. 1971, 251, 1-6.
- 14) Ogata, K.; Ho, T.; Okazaki, T.; Dan, K.; Nomura, T.; Nozawa, Y.; Kajita, A. Hemoglobin 1986, 10, 469-481.
- 15) Yeager, A.M.; Zinkham, W.H.; Jue, D.L.; Winslow, R.M.; Johnson, M.H.; McGuffey, J.E.; Moo-Penn, W.F. Ped. Res. 1983, 17, 503-507.
- 16) Charache, S.; Brimhall, B.; Milner, P.; Cobb, L. J. Clin. Invest. 1973, 52, 2858-2864.
- 17) Marinucci, M.; Giuliani, A.; Maffi, D.; Massa, A.; Giampolo, A.; Mavilio, F.; Zannotti, M.; Tantori, L. Biochem. Biophys. Acta. 1981, 668, 209-215.

- 18) Garel, M.C.; Hasson, W.; Coquelet, M.T.; Goosens, M.; Rosa, J.; Arous, N. Biochem. Biophys. Acta. 1976, 420, 97-104.
- 19) Shih, D.T.; Jones, R.T.; Shih, M.F.C.; Jones, M.B.; Koler, R.D.; Hemoglobin 1987, 11, 453-464.
- 20) Steadman, J.H.; Yates, A.; Huehns, E.R.; Brit., J. Haematol 1970, 18, 435-446.
- 21) Stamotoyannopoulos, G.; Parer, J.T.; Finch, C. New Eng. J. Med. 1969, 281, 915-919.
- 22) Anderson, N.L.; Perutz, M.F.; Stamotoyannopoulos, G. Nature New Biol. 1973, 243, 275-276.
- 23) Jones, R.T.; Brimhall, B.; Pootrakul, S.; Gray, G. J. Mol. Evol. 1976, 2, 37-44.
- 24) Konotey-Ahulu, F.I.D.; Gallo, E.; Lehmann, H.; Ringelhann, B. J. Med. Genet. 1968, 5, 107-111.
- 25) Schneider, R.G.; Hosty, T.S.; Tomlin, G.; Atkins, R.; Brimhall, B.; Jones, R.T. Biochem Genet. 1975, 13, 411-415.
- 26) Sugihara, J.; Imamura, T.; Nagafuchi, S.; Boneventura, J.; Boneventura, C.; Cashon, R. J. Clin. Invest. 1985, 76, 1169-1173.
- 27) Tatsis, B.; Sofroniadou, K.; Stergiopoulos, C.I. Blood 1976, 47, 827-832.

- 28) Merault, G.; Keclard, L.; Saint-Martin, C.;
Jasmin, K.; Campier, A.; Delanoe Garin, J.;
Arous, N.; Fortune, R.; Theodore, M.;
Seytor, S.; Rosa, J.; Blouquit, Y.;
Galacteros, F. Febs Lett. 1985, 184, 10-
13.

- 29) Imar, K.; Morimoto, H.; Kotani, M.;
Shibata, S.; Miyaji, T.1 Matsutomo, K.
Biochem. Biophys. Acta. 1970, 200, 197-202.

- 30) Ahern, E.; Ahern, V.; Hilton, T.; Serjeant,
G.D.; Serjeant, B.E.; Seakins, M.; Lang,
A.; Middleton, A.; Lehmann, H. Febs Lett.
1976, 69, 99-102.

- 31) Boneventura, J.; Riggs, A.; J. Biol. Chem.
1968, 243, 980-991.

- 32) Nagel, R.L.; Lynfield, J.; Johnson, J.;
Landeau, L.; Bookchin, R.M.; Harris, M.B.
N. Eng. J. Med. 1976, 295, 125-130.

- 33) Arous, N.; Braconnier, F.; Thillet, J.;
Blouquit, Y.; Galacteros, F.; Chevrier, M.;
Bordahandy, C.; Rosa, J. Febs Lett. 1981,
126, 114-116.

- 34) Efremov, G.D.; Huisman, T.H.J.; Smith,
L.L.; Wilson, J.B.; Kitchens, J.L.;
Wrightston, R.N.; Adams, H.R.; J. Biol.
Chem. 1969, 244, 6105-6116.

- 35) Turner, J.W.; Jones, R.T.; Brimhall, B.;
DuVal, M.C.; Koler, R.D. Biochem. Genet.
1976, 14, 577-585.

- 36) Imamura, T.; Fujita, S.; Ohta, Y.; Hanada, M.; Yanase, T. J. Clin. Invest. 1969, 48, 2341-2348.
- 37) Moo-Penn, W.F.; Wolff, J.A.; Simon, G.; Vacek, M.; Jue, D.L.; Johnson, M.H. Febs Lett. 1978, 92, 53-56.
- 38) King, M.A.R.; Willshire, B.G.; Lehmann, H.; Marimoto, H. Br. J. Haem. 1972, 22, 125-134.
- 39) Ranney, H.M.; Jacobs, A.S.; Nagel, R.L. Nature 1967, 213, 876-878.
- 40) Minnich, V.; Hill, R.J.; Khuri, P.D.; Anderson M.E. Blood 1965, 25, 830-838.
- 41) Ohba, Y.; Miyaji, T.; Murakami, M.; Kadowaki, S.; Fujita, T.; Oimoni, M.; Hatanaka, H.; Ishikawa, K.; Baba, S.; Hitaka, K.; Imai, K. Hemoglobin 1986, 10, 109-126.

3. TÁBLÁZAT A NEM-TERMÉSZETESEN ELŐFORDULÓ ALACSONY
AFFINITÁSÚ MUTÁNSOK JELÖLTJEI

ALFA LÁNC

46 phe-->thr
46 phe-->ser
46 phe-->ala
58 his-->phe
58 his-->trp
61 lys-->thr
61 lys-->ser
61 lys-->met
61 lys-->asn
62 val-->leu
62 val-->ile
62 val-->phe
62 val-->trp
65 ala-->asp
94 asp-->gln
94 asp-->thr
94 asp-->ser
94 asp-->lys
94 asp-->gly
94 asp-->arg

BÉTA LÁNC

21 asp-->ala
21 asp-->ser
45 phe-->ala
45 phe-->thr
45 phe-->val
63 his-->phe
63 his-->trp
66 lys-->ser

66 lys-->asn

3. TÁBLÁZAT (folytatás)

67 val-->phe
67 val-->trp
67 val-->ile
70 ala-->glu
70 ala-->ser
70 ala-->thr
96 leu-->phe
96 leu-->his
96 leu-->lys
98 val-->trp
98 val-->phe
102 asn-->asp
102 asn-->glu
102 asn-->arg
102 asn-->his
102 asn-->gly
108 asn-->arg
108 asn-->glu

4. TÁBLÁZA

NAGY OXIGÉN AFFINITÁSÚ TERMÉSZETESEN ELŐFORDULÓ
HEMOGLOBIN MUTÁNSOK

<u>SZERKEZET</u>	<u>NÉV</u>
A. alfa lánc mutánsok	
6 (A4)	Asp->AlaSawara
	Asp->AsnDunn
	Asp->ValFerndown
	Asp->TyrWoodville
	Lys->AsnAlbany-Suma
40 (C5)	Lys->GluKariya
44 (CE2)	Pro->LeuMilledgeville
	Pro->ArgKawachi
45 (CE3)	His->ArgFort de France
85 (F6)	Asp->AsnG-Norfolk
92 (FG4)	Arg->GlnJ-Cape Town
	Arg->LeuChesapeake
95 (G2)	Pro->LeuG-Georgia
	Pro->SerRampa
	Pro->AlaDenmark Hill
	Pro->ArgSt. Luke's
97 (G4)	Asn->LysDallas
126 (H9)	Asp->AsnTarrant
141 (HC3)	Arg->HisSuresnes
	Arg->SerJ-Cubujuqui
	Arg->LeuLegnano
B. béta lánc mutánsok	
2 (NA2)	His->ArgDeer Lodge
	His->GlnOkayama
20 (B2)	Val->MetOlympia
23 (B5)	Val->AspStrasbourg
	Val->PhePalmerston North

4. TÁBLÁZAT (folytatás)

34 (B16)	Val->PhePitie-Salpetriere
36 (C2)	Pro->ThrLinkoping
37 (C3)	Trp->SerHirose
40 (C6)	Arg->LysAthens-Ga
	Arg->SerAustin
51 (D2)	Pro->ArgWillamette
	Leu->HisBrisbane
79 (EF3)	Asp->Gly G-Hsi-Tsou
	Lys->ThrRahere
	Lys->MetHelsinki
89 (F5)	Ser->AsnCreteil
	Ser->ArgVanderbilt
94 (FG1)	Asp->HisBarcelona
	Asp->AsnBunbury
96 (FG3)	Leu->Val Regina
97 (FG4)	His->GlnMalmo
	His->LeuWood
99 (G1)	Asp->AsnKempsey
	Asp->HisYakima
	Asp->AlaRadcliffe
	Asp->Tyr Ypsilanti
	Asp->GlyHotel-Dieu
	Asp->Val Chemilly
100 (G2)	Pro->LeuBrigham
101 (G3)	Glu->LysBritish Columbia
	Glu->GlyAlberta
	Glu->AspPotomac
103 (G5)	Phe->LeuHeathrow
109 (G11)	Val->MetSan Diego
121 (GH4)	Glu->GlnD-Los Angeles
	Pro->GlnTu Gaid
	Ala->ProCrete
140 (H18)	Ala->ThrSt.-Jacques
142 (H20)	Ala->AspOhio
143 (H21)	His->ArgAbruzzo

4. TÁBLÁZAT (folytatás)

	His->GlnLittle Rock
	His->ProSyracuse
144 (HC1)	Lys->AsnAndrew-Minneapolis
145 (HC2)	Tyr->HisBethesda
5	Tyr->CysRainier
	Tyr->AspFort Gordon
	Tyr->TermMcKees Rocks
146 (HC3)	His->AspHiroshima
	His->ProYork
10	His->LeuCowtown

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy nem természetesen előforduló, pszeudotetramer hemoglobin-szerű protein azzal jellemezve, hogy négy globin-szerű domént tartalmaz, az említett pszeudotetramer két alapvetően homológ globin-szerű doménnel rendelkező pszeudodimer polipeptidet tartalmaz, melyek közül az egyiket úgy mutáltattuk, hogy az említett pszeudodimer polipeptid másik globin-szerű doménjében nem szereplő aszimmetrikus keresztköthető cisztein maradékot biztosítson, az említett pszeudotetramer továbbá legalább egy másik globin-szerű domén-hordozó polipeptidet tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti két vagy több pszeudotetramer hemoglobin-szerű proteinből felépülő nem természetesen előforduló multimer hemoglobin-szerű protein azzal jellemezve, hogy az első pszeudotetramer aszimmetrikus keresztköthető cisztein maradékát keresztkötöttük egy második pszeudotetramer aszimmetrikus keresztköthető cisztein maradékához.

3. A 2. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a keresztkötés egy diszulfid kötést jelent.

4. A 3. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a keresztkötést a pszeudotetramerek sokfunkciós tiol-specifikus keresztkötő reagenssel való reakciójából megvalósítható.

5. A 4. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a keresztkötő reagens egy olyan keresztkötést hoz létre, mely az ugyanezen maradékok között létrejött diszulfid kötéseknel a plazmával endogén redukáló anyagokkal kevésbé redukálható.

6. A 4. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a keresztkötés egy tioéter vagy tio-maleimid keresztkötést jelent.

7. A 4. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a keresztkötő reagens tiol-specifikus reaktív egységekkel

rendelkező polietilén glikol származékot jelent.

8. A 2. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a protein két pszeudotetramerből áll.

9. A 4. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a protein kettőnél több pszeudotetramerből áll.

10. A 4. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a keresztkötő anyag egy peptid egységet tartalmaz.

11. A 10. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a keresztkötő anyag egy vagy több D-aminosavat tartalmaz.

12. A 10. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a peptid egység egy stabil, kinyújtott másodlagos szerkezettel rendelkezik.

13. A 12. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a peptid egység egy poliprolin hélixet képez.

14. A 12. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a keresztkötő anyag egy kétszálú felcsavart orsót jelent.

15. A 14. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a felcsavart orsó két szála diszulfid keresztkötéssel kapcsolódik.

16. A 12. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a keresztkötő anyag négy helikális vagy egy négy-szálú felcsavart orsót tartalmaz.

17. A 12. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a peptid egység egy elágazó láncot tartalmaz.

18. A 4. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a keresztkötés egy negatív töltésű egységet tartalmaz, ahol a protein izoelektromos pontja csökkentettük.

19. A 18. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a negatív töltésű egység Asp és/vagy Glu maradékok sokaságát tartalmazza.

20. Egy nem-természetesen előforduló pszeudooligomer

polipeptid azzal jellemezve, hogy négy vagy több globin-szerű domént tartalmaz.

21. A 20. igénypont szerinti polipeptid azzal jellemezve, hogy az említett polipeptid interdomén spacerként egy poliprolin helixet tartalmaz.

22. A 20. igénypont szerinti polipeptid azzal jellemezve, hogy az említett polipeptid interdomén spacerként egy poliaszpartát vagy poliglutamát hélixek tartalmaz.

23. A 20. igénypont szerinti polipeptid azzal jellemezve, hogy az említett polipeptid interdomén spacerként egy Artemia kötőt tartalmaz.

24. A 20. igénypont szerinti polipeptid azzal jellemezve, hogy az említett polipeptid interdomén spacerként egy helikális felcsavart orsót tartalmaz.

25. A 20. igénypont szerinti polipeptid azzal jellemezve, hogy a globin-szerű domének humán alfa globin-szerű domének és az interdomén spacer megközelítően 20-50 Å lehet.

26. A 25. igénypont szerinti polipeptid azzal jellemezve, hogy az interdomén spacer $-(\text{Gly})_7$, $-(\text{Gly})_{1-3}(\text{Ala})_{12}-(\text{Gly})_{1-3}$, $-(\text{Gly})_{1-3}(\text{Pro})_{12-16}-(\text{Gly})_{1-3}$, vagy $-(\text{Gly})_{1-3}(\text{Asp})_{1-30}-(\text{Gly})_{1-3}$ lehet.

27. Egy nem-természetesen előforduló multimer hemoglobinszerű protein azzal jellemezve, hogy a 20-26 igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet és egy vagy több további globin-szerű domén-hordozó polipeptid láncot tartalmaz.

28. Egy nem-természetesen előforduló oktamer hemoglobinszerű protein azzal jellemezve, hogy két olyan tetramert tartalmaz, melyekben az egyes tetramerek két humán alfa globin-szerű domént és két béta globin-szerű domént tartalmaznak, az egyik tetramer ciszteinjé a második domén megfelelő ciszteinjéhez egy diszulfid

kötéssel kapcsolódik, egy harmadik tetramer keresztköötődését alapjában véve szterikusan védjük ki, azzal a megköötéssel, hogy a keresztköötödő cisztein nem a béta 83-nál (Hemoglobin Ta Li) található.

29. A 28. igénypont szerinti protein azzal jellemezve, hogy a keresztköötödő cisztein a 2. Ábrán bemutatott mutációs helynél található.

30. A 2-19 és a 21-29 igénypontok bármelyike szerinti protein azzal jellemezve, hogy az említett protein P_{50} értéke 24-32 körül mozog.

31. A 2-19 és a 21-29 igénypontok bármelyike szerinti protein azzal jellemezve, hogy az említett protein a plazmában levő normál hemoglobin-mentes proteinnél jelentősen hosszabb intravasculáris retenciával rendelkezik.

32. Eljárás a vér oxigén hordozó kapacitásának kiegészítésére azzal jellemezve, hogy egy betegnek a 32. igénypont szerinti összetételt adunk, vagy egy olyan összetételt mely a 2-19 és a 21-29 igénypontok bármelyike szerinti proteineket tartalmazza.

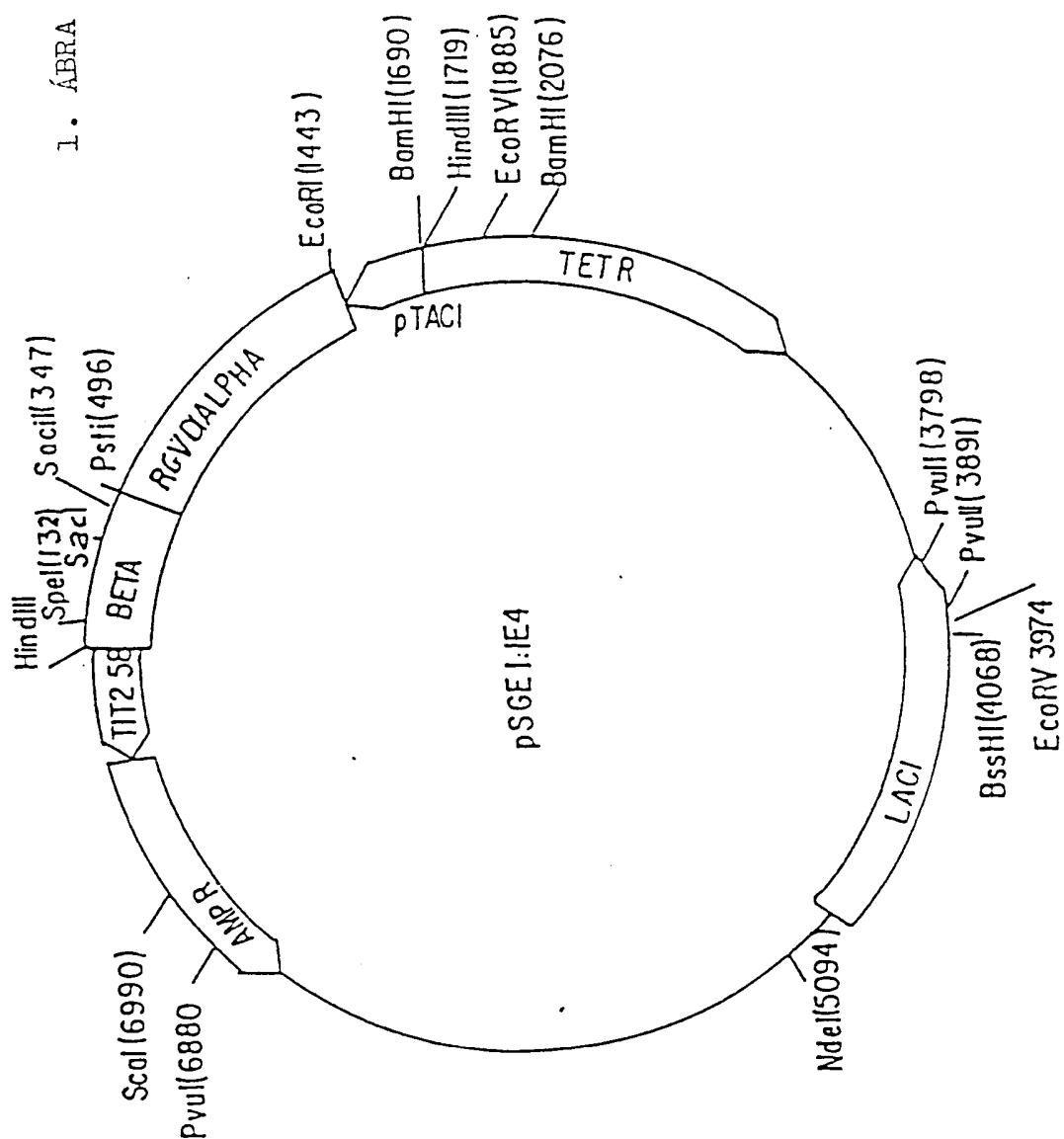
33. A 2-19 és a 21-31 igénypontok bármelyike szerinti protein alkalmazása azzal jellemezve, hogy vérpótló összetétel előállítására használjuk.

A meghatalmazott

Bevett

Dr. Szendrői Ádám
Tel.: 155-5733, Fax: 155-5734

1. ÁBRA



Dr. Szendrői Ádám
szegedi Egyetem
az S.J.E. & K. Budapesti Nemzetközi
Szegedi Egyetem
H-1061 Budapest, Duna utca 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3734

30403

12/2

/EcoRI

/XmaI

A

A ATT CGA GCT CGG TAC CCG GGC TAC ATG GAG
AAA AGG CGC CAA TGA CGA GAC ACC CCA

SD#1

SD#2

ATT AAC TCA ATC TAG AGG GTA TTA ATA ATG TAT CGC TTA AAT AAG GAG
TAA TTG AGT TAG ATC TCC CAT AAT TAT TAC ATA GCG AAT TTA TTC CTC
met tyr arg leu asn lys glu
RIBOSOMAL LOADER →

/NdeI

/EagI

GAA TAA CAT ATG CTG TCT CCG GCC GAT AAA ACC AAC GTT AAA GCT GCT
CTT ATT GTA TAC GAC AGA GGC CGG CTA TTT TGG TTG CAA TTT CGA CGA
glu met leu ser pro ala asp lys thr asn val lys ala ala
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
→ | des-val alpha globin

/XhoI

TGG GGT AAA GTT GGC CGC CAC GCT GGT GAA TAC GGT GCT GAA GCT CTC
ACC CCA TTT CAA CCG CGC GTG CGA CCA CTT ATG CCA CGA CTT CGA GAG
trp gly lys val gly ala his ala gly glu tyr gly ala glu ala leu
14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29

GAG CGT ATG TTC CTG TCT TTC CCG ACC ACC AAA ACC TAC TTC CCG CAC
CTC GCA TAC AAG GAC AGA AAG GGC TGG TGG TTT TGG ATG AAG GGC GTG
glu arg met phe leu ser phe pro thr thr lys thr tyr phe pro his
30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45

/MstI

TTC GAC CTG TCT CAC GGT TCT CGC CAG GTT AAA GGT CAC GGT AAA AAA
AAG CTG GAC AGA GTG CCA AGA GCG GTC CAA TTT CCA GTG CCA TTT TTT
phe asp leu ser his gly ser ala gln val lys gly his gly lys lys
46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61

GTT GCT GAT GCT CTG ACC AAC GCT GTT GCT CAC GTT GAT ATG CCG
CAA CGA CTA CGA GAC TGG TTG CGA CAA CGA GTG CAA CTA CTA TAC GGC
val ala asp ala leu thr asn ala val ala his val asp asp met pro
62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77

/Mlu I

AAC GCG TTG TCT GCT CTG TCT GAT CTG CAC GCT CAC AAA CTG CGT GTT
TTG CGC AAC AGA CGA GAC AGA CTA GAC GTG CGA GTG TTT GAC GCA CAA
asn ala leu ser ala leu ser asp leu his ala his lys leu arg val
78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93

2. ÁBRA

Hj. Szentpéteri Adára
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & B. Budapesti Nemzeti Szabadalmi Hivatalban
H-1061 Budapest, Rákóczi út 110.
Telefon: 153-5735, Fax: 153-3664

/HpaI

GAT CCG GTT AAC TTC AAA CTG CTG TCT CAC TGC CTG CTG GTT ACT CTG
 CTA GGC CAA TTG AAG TTT GAC GAC AGA GTG ACG GAC CAA TGA GAC
 asp pro val asn phe lys leu leu ser his cys leu leu val thr leu
 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109

/NaeI

GCT GCT CAT CTG CCG GCT GAA TTT ACC CCG GCT GTT CAT GCG TCT CTG
 CGA CGA GTA GAC GGC CGA CTT AAA TGG GGC CGA CAA GTA CGC AGA GAC
 ala ala his leu pro ala glu phe thr pro ala val his ala ser leu
 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125

/BstBI

GAT AAA TTC CTG GCT TCT GTT TCT ACC GTT CTG ACT TCG AAA TAC CGT
 CTA TTT AAG CAC CGA AGA CAA AGA TGG CAA GAC TGA AGC TTT ATG GCA
 asp lys phe leu ala ser val ser thr val leu thr ser lys tyr arg
 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141
 end first alpha globin →

/EagI

GGT GTT CTG TCT CCG GCC GAT AAA ACC AAC GTT AAA GCT GCT
 CCA CAA GAC AGA GGC CGG CTA TTT TGG TTG CAA TTT CGA CGA
 gly val leu ser pro ala asp lys thr asn val lys ala ala
 1' 2' 3' 4' 5' 6' 7' 8' 9' 10' 11' 12' 13'

linker

→ second alpha globin →

/XhoI

TGG GGT AAA GTT GGC GCG CAC GCT GGT GAA TAC GGT GCT GAA GCT CTC
 ACC CCA TTT CAA CCG CGC GTG GCA CCA CTT ATG CCA CGA CTT CGA GAG
 trp gly lys val gly ala his ala gly glu tyr gly ala glu ala leu
 14' 15' 16' 17' 18' 19' 20' 21' 22' 23' 24' 25' 26' 27' 28' 29'

GAG CGT ATG TTC CTG TCT TTC CCG ACC ACC AAA ACC TAC TTC CCG CAC
 CTC GCA TAC AAG GAC AGA AAG GGC TGG TGG TTT TGG ATG AAG GGC GTG
 glu arg met phe leu ser phe pro thr thr lys thr tyr phe pro his
 30' 31' 32' 33' 34' 35' 36' 37' 38' 39' 40' 41' 42' 43' 44' 45'

/MstI

TTC GAC CTG TCT CAC GGT TCT GCG CAG GTT AAA GGT CAC GGT AAA AAA
 AAG CTG GAC AGA GTG CCA AGA GCG GTC CAA TTT CCA GTG CCA TTT TTT
 phe asp leu ser his gly ser ala gin val lys gly his gly lys lys
 46' 47' 48' 49' 50' 51' 52' 53' 54' 55' 56' 57' 58' 59' 60' 61'

2. ÁBRA FOLYTATÁSA

GTT GCT GAT CGT CTG ACC AAC GCT GTT GCT CAC GTT GAT GAT ATG CCG
CAA CGA CTA CGA GAC TGG TTG CGA CAA CGA GTG CAA CTA CTA TAC GGC
val ala asp ala leu thr asn ala val ala his val asp asp met pro
62' 63' 64' 65' 66' 67' 68' 69' 70' 71' 72' 73' 74' 75' 76' 77'

/Mlu I

AAC GCG TTG TCT GCT CTG TCT GAT CTG CAC GCT CAC AAA CTG CGT GTT
TTG CGC AAC AGA CGA GAC AGA CTA GAC GTG CGA GTG TTT GAC GCA CAA
asn ala leu ser ala leu ser asp leu his ala his lys leu arg val
78' 79' 80' 81' 82' 83' 84' 85' 86' 87' 88' 89' 90' 91' 92' 93'

/HpaI

GAT CCG GTT AAC TTC AAA CTG CTG TCT CAC TGC CTG CTG GTT ACT CTG
CTA GGC CAA TTG AAG TTT GAC GAC AGA GTG ACG GAC GAC CAA TGA GAC
asp pro val asn phe lys leu leu ser his cys leu leu val thr leu
94' 95' 96' 97' 98' 99' 100' 101' 102' 103' 104' 105' 106' 107' 108' 109'

/NaeI

GCT GCT CAT CTG CCG GCT GAA TTT ACC CCG GCT GTT CAT GCG TCT CTG
CGA CGA GTA GAC GGC CGA CTT AAA TGG GGC CGA CAA GTA CGC AGA GAC
ala ala his leu pro ala glu phe thr pro ala val his ala ser leu
110' 111' 112' 113' 114' 115' 116' 117' 118' 119' 120' 121' 122' 123' 124' 125'

/BstBI

GAT AAA TTC CTG GCT TCT GTT TCT ACC GTT CTG ACT TCG AAA TAC CGT
CTA TTT AAG CAC CGA AGA CAA AGA TGG CAA GAC TGA AGC TTT ATG GCA
asp lys phe leu ala ser val ser thr val leu thr ser lys tyr arg
126' 127' 128' 129' 130' 131' 132' 133' 134' 135' 136' 137' 138' 139' 140' 141'

end of second alpha globin

/PstI

TAA TGA C TGC A
ATT ACT G

GC TAC ATG GAG ATT AAC TCA
ACG TCG ATG TAC CTC TAA TTG AGT

SD#1

SD#2

/NdeI

ATC TAG AGG GTA TTA ATA ATG TAT GCG TTA AAT AAG GAG GAA TAA CAT
TAG ATC ACC CAT AAT TAT TAC ATA GCG AAT TTA TTC CTC CTT ATT GTA
met tyr arg leu asn lys glu glu
→ribosomal loader→

2. ÁBRA FOLYTATÁSA

/SacII

ATG	CAC	CTG	ACT	CCG	GAA	GAA	AAA	TCC	GCG	GTT	ACT	GCT	CTG	TGG	GGT
TAC	GTG	GAC	TGA	GGC	CTT	CTT	AAA	AGG	CGC	CAA	TGA	CGA	GAC	ACC	CCA
met	his	leu	thr	pro	glu	glu	lys	ser	ala	val	thr	ala	leu	trp	gly
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

→ beta globin →

AAA	GTG	AAC	GTT	GAC	GAA	GTT	GGT	GGT	GAA	GCT	CTG	GGA	CGT	CTG	CTG
TTT	CAC	TTG	CAA	CTG	CTT	CAA	CGA	CCA	CTT	GGA	GAC	CCT	GCA	GAC	GAC
lys	val	asn	val	asp	glu	val	gly	gly	glu	ala	leu	gly	arg	leu	leu
17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32

/BglII

GTT	GTT	TAC	CCG	TGG	ACT	CAG	CGT	TTC	TTT	GAA	TCT	TTC	GGA	GAT	CTG
CAA	CAA	ATG	GGC	ACC	TGA	GTC	GCA	AAG	AAA	CTT	AGA	AAG	CCT	CTA	GAC
val	val	tyr	pro	trp	thr	gln	arg	phe	phe	glu	ser	phe	gly	asp	leu
33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48

2. ÁBRA FOLYTATÁSA

/NcoI

TCT ACC CCG GAC CGT GTT ATG GGT AAC CCG AAA GTT AAA GCC CAT GGT
 AGA TGG TTC CTG CGA CAA TAC CCA TTG GGC TTT CAA TTT CGG GTA CCA
ser thr pro asp ala val met gly asn pro lys val lys ala his gly
 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64

AAA AAA GTT CTG GGT CGT TTC TCT GAC GGT CTG GCT CAC CTG GAC AAC
 TTT TTT CAA GAC CCA CGA AAG AGA CTG CCA GAC CGA GTG GAC CTG TTG
lys lys val leu gly ala phe ser asp gly leu ala his leu asp asn
 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

/KpnI

/SacI

CTG AAA GGT ACC TTC GCT ACT CTG TCT GAG CTC CAC TGC GAC AAA CTG
 GAC TTT CCA TGG AAG CGA TGA GAC AGA CTC GAG GTG ACG CTG TTT GAC
 leu lys gly thr phe ala thr leu ser glu leu his cys asp lys leu
 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96

/SpeI

CAC GTT GAC CCG GAA AAC TTC CGT CTG CTG GGT AAC GTA CTA GTT TGC
 GTG CAA CTG GGC CTT TTG AAG GCA GAC GAC CCA TTG CAT GAT CAA ACG
 his val asp pro glu asn phe arg leu leu gly asn val leu val cys
 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112

/EcoRI

GTT CTG GCT CAC CAC TTC GGT AAA GAA TTC ACT CCG CCG GTT CAG GCT
 CAA GAC CGA GTG GTG AAG CCA TTT CTT AAG TGA GGC GGC CAA GTC CGA
 val leu ala his his phe gly lys glu phe thr pro pro val gln ala
 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128

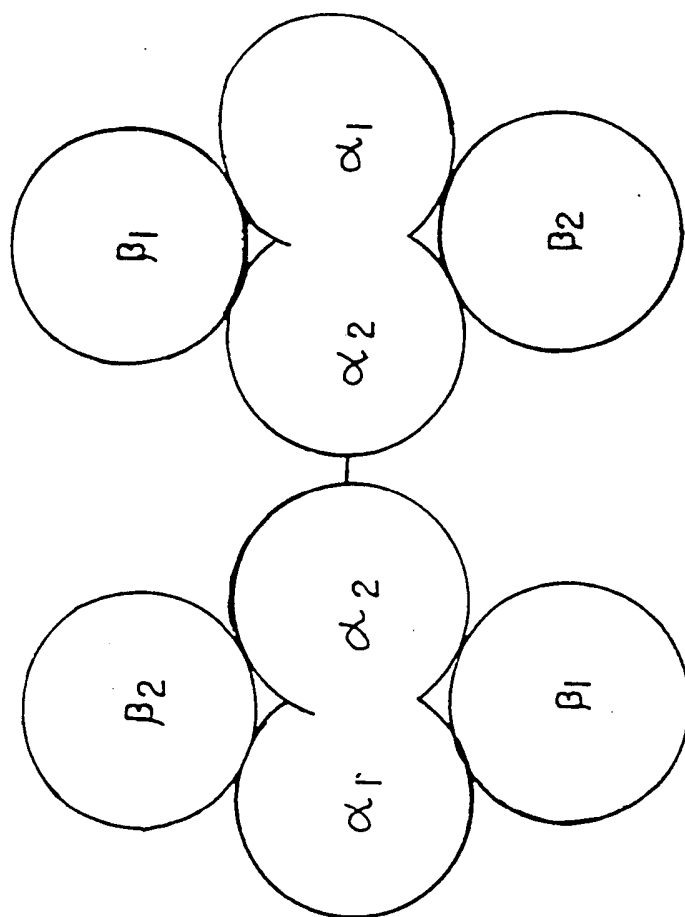
GCT TAC	CAG AAA GTT GTT GCT GGT GTT GCT AAC GCG CTA GCT CAC AAA
CGA ATG	GTC TTT CAA CAA CGA CCA CAA CGA TTG CGC GAT CGA GTG TTT
ala tyr	glh lys val val ala gly val ala asn ala leu ala his lys
129 130	131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144

/HindIII

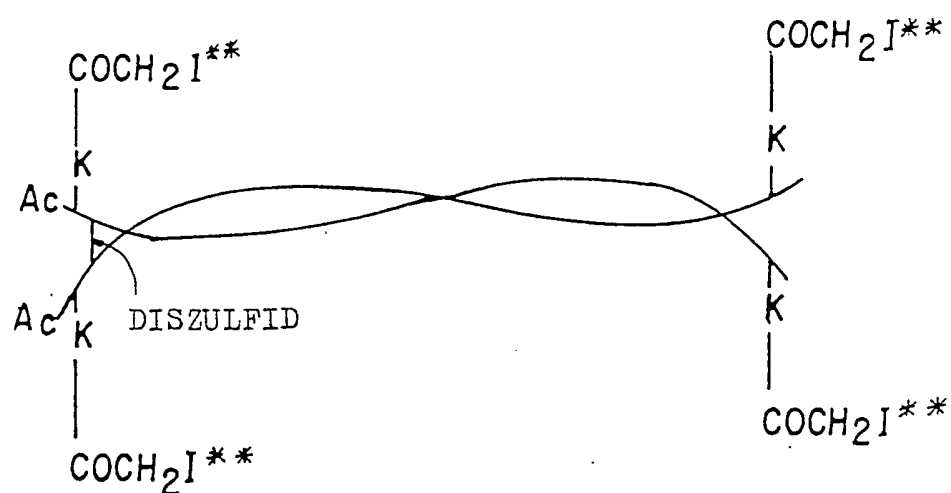
TAC CAC	TAA TGA
ATG GTG	ATT ACT TCG A
tyr his	
145 146	
End beta globin +	

2. ÁBRA FOLYTATÁSA

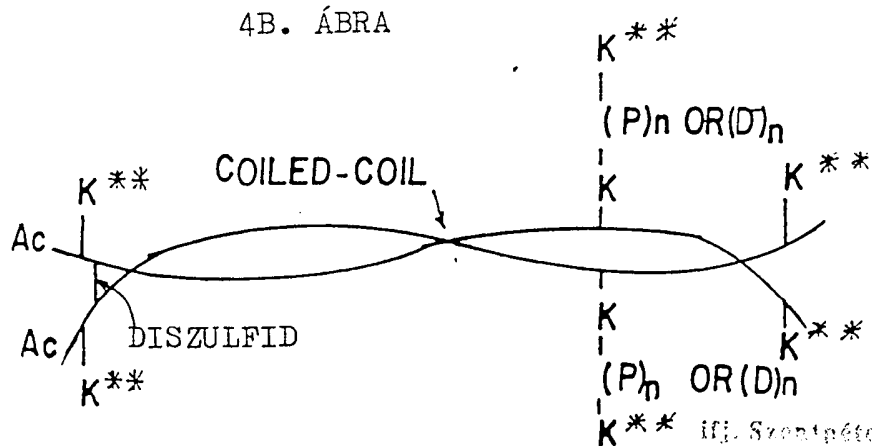
3. ÁBRA



4A; ÁBRA

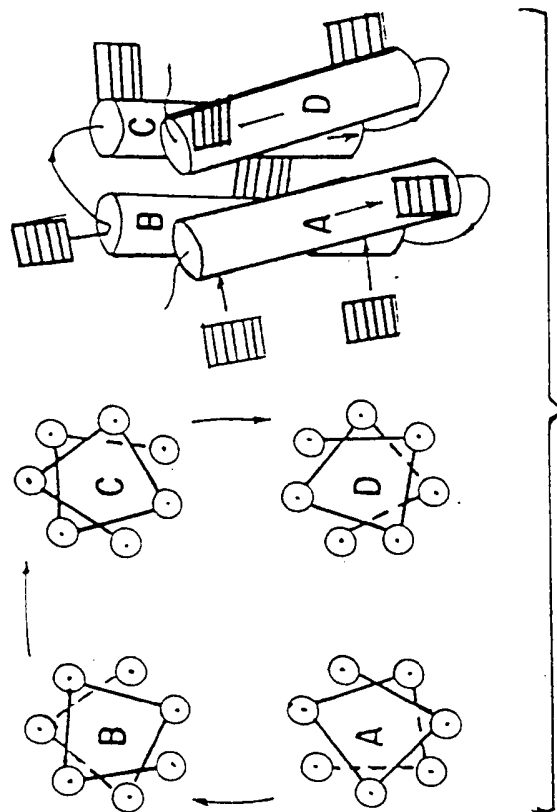


4B. ÁBRA

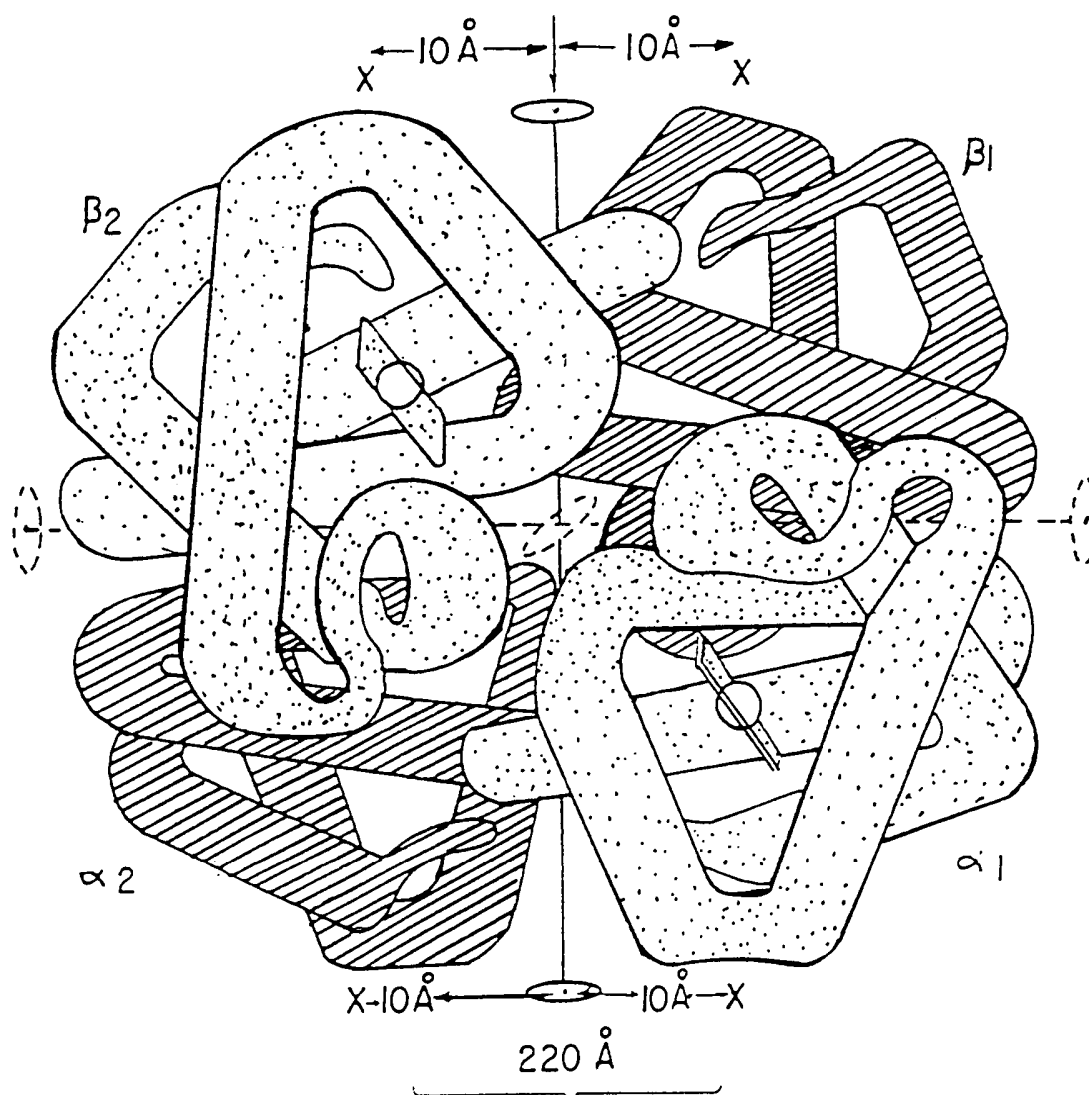


Dr. Szentpéteri Ádám
 Szabados Ágnes
 az S.B.G. & I. Budapesti Nemzetközi
 Szakmai Tanácsadó
 H-1061 Budapest, Dózsa György út 10.
 Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

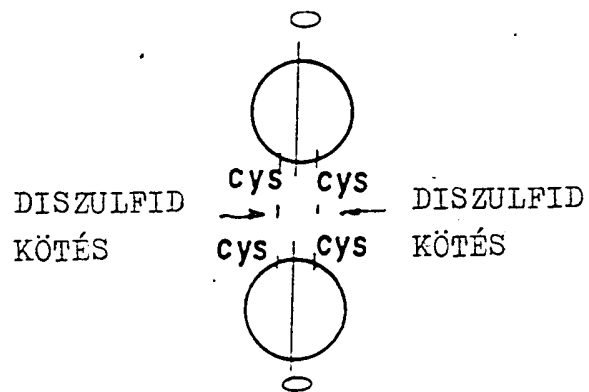
4C. ÁBRA



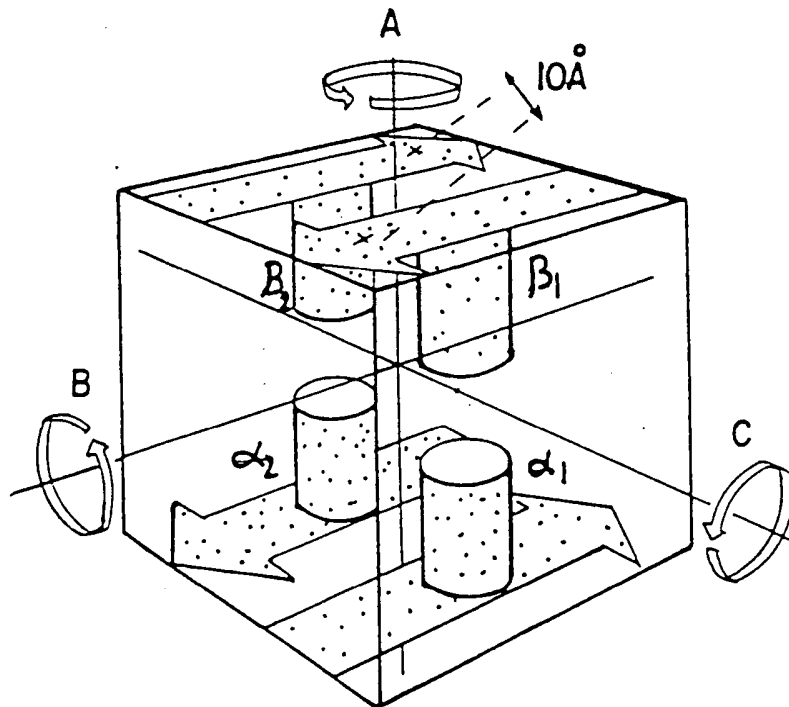
5A. ÁBRA



5B. ÁBRA



5C. ÁBRA



Dr. Szentpéteri Ádám
Széchenyi Egyetem
az S.B.C. és B. Kémiai Nemzetközi
Szakosztályok elnöke
H-1051 Budapest, Dabóczy u. 19.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3604

6. ÁBRA

