

P0201-52

A *Hirudinaria manillensis*-ből származó
hialuronidáz; izolálása, tisztítása és rekombináns
előállítási módszere

A2

K I V O N A T

A találmány tárgyát egy új, a *Hirudinaria manillensis* trópusi piócából származó hialuronidáz (a „manilláz”) izolálása, tisztítása és jellemzése képezi. A találmány tárgyát képezi továbbá a manilláz rekombináns előállítási eljárása, amely magába foglalja a DNS és aminosav szekvenciák, expressziós vektorok és gazdarendszerek feltárását. A találmány tárgyát képezi a manilláz terápiás célokra történő alkalmazása is, például miokardiális betegségek, trombózisos esetek és tumorok kezelésére.



W

2002.05.16.

**A *Hirudinaria manillensis*-ből származó
hialuronidáz; izolálása, tisztítása és rekombináns
előállítási módszere**

A találmány tárgyát egy új, a *Hirudinaria manillensis* trópusi piócából származó hialuronidáz izolálása, tisztítása és jellemzése képezi. A leírás során az új enzimre a „manilláz” névvel hivatkozunk. A találmány tárgyát képezi továbbá a manilláz rekombináns előállítási eljárása, amely magába foglalja a DNS és aminosav szekvenciák, expressziós vektorok és gazdarendszerek feltárását. A találmány tárgyát képezi a manilláz terápiás célokra történő alkalmazása is, például miokardiális betegségek, trombózisos esetek és tumorok kezelésére.

A hialuronsav vagy hialuronán (HA) egy lineáris, elágazás nélküli nagy molekulatömegű ($2-6 \times 10^6$) glükóz-aminoglikán, amelyet a $\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcUA}$ ismétlődő diszacharid szerkezet alkot. Ennek karboxil csoportjai teljes mértékben ionizáltak az extracelluláris folyadékok uralkodó pH tartományában, akár normál akár patológiás esetekben. A HA a kondroitin szulfátokkal, keratán szulfátokkal és heparinokkal együtt a glükóz-aminoglikánok csoportjába tartozik [Jeanloz: Arth. Rheum. 3 233 (1960)]. Más módosítatlan glükóz-aminoglikánokkal (GAG) szemben ez nem rendelkezik szulfát szubsztitúcióval vagy kovalensen kapcsolt peptiddel, és lánchoossza, valamint molekulatömege rendszerint sokkal na-

Aktaszámunk: 95647-903/PÁ

gyobb. A HA mindenütt megtalálható a kötőszövetekben és a test csaknem az összes részében megtalálták a javított fixálási módszer [Hellström és mtsai.: Histochem. J. 22 677 (1990)] és a hialuronán-kötő peptideket (HABP) alkalmazó specifikus hisztokémiai módszer bevezetése óta. Ugyancsak megtalálható a neuro-ektodermális eredetű szövetekben a fejlődés során és érett állapotban.

A hialuronidáz kifejezés alatt általánosságban és a leírás során olyan enzimet értünk, amely hialuronsav szubsztráton működik, az egyéb szubsztrátokkal szemben mutatott aktivitástól függetlenül.

A hialuronidázt először mikroorganizmusokból izolálták és később emlős heréből, amely manapság a fő forrása [Meyer: In: The Enzyme, 307. oldal, (1971)]. A reakció-mechanizmusnak megfelelően a hialuronidázokat három fő csoportba soroljuk.

Az első csoportba azokat a mikrobiális enzimeket soroljuk, amelyek a szubsztrátjukon β -eliminációt hoznak létre, Δ -4,5 telítetlen diszacharidokat eredményezve. Az enzimeket ezért tehát hialuronát liázoknak kell neveznünk, EC 4.2.99.1.

A második csoportot hialuron-glükózaminidázok vagy here-típusú hialuronidázok képezik (EC 3.2.1.35) amelyek mint endo-N-acetil- β -D-hexózaminidáz működnek, a HA-t kisebb fragmensekké lebontva, az első lépésben tetraszachariddá, amelyben a hexózamin részegység a szabad redukáló végen található. A here eredetű hialuronidázhoz hasonló tulajdonságokkal rendelkező enzimeket nyertek ki ebihalakból, kígyó-

méregből, méhmeméregből, számos állati szövetből, humán szérumból és más forrásokból. Jól ismert, hogy a heréből származó hialuronidáz transzglykoziláz aktivitással is rendelkezik [Weissmann és mtsai.: J. Biol. Chem. 208 417 (1954)]. A hialuronidázok ezen csoportjához tartozó enzimek nem csak a hialuronát irányában fejtenek ki enzimaktivitást, hanem a kondroitin-4-szulfát, kondroitin-6-szulfát, kondroitin és dermatán szulfát irányában is.

A harmadik csoportot hialuron-glükuronidázok (EC 3.2.1.36) alkotják, amelyek mint endo- β -glükuronidázok működnek. Ezt az enzimet a *Hirudo medicinalis* piócákban izolálták [Yuki és Fishman: J. Biol. Chem. 238 1877 (1963)] és tökéletesen specifikus HA-ra. A kondroitin szulfát, dermatán és heparin nem szubsztrátjai ennek a hialuronidáznak. Ez csak a hialuronsavat bontja le tetraszachariddá, amelyben a glükuronsav a szabad redukáló végen található [Linker és mtsai.: J. Biol. Chem. 235 924 (1960)]. Az emlős eredetű endo- β -glükóz-amidinázokkal ellentétben, a heparinnak nincs hatása ezen pióca eredetű hialuronidáz aktivitására. Ennek következtében egy páciensnek a véralvadás gátló anyagként kiterjedten alkalmazott heparinnal és származékaival együtt is beadható. Egy körülbelül 28,5 kDa molekulatömegű hialuronsav specifikus endo-béta glükuronidáz (elnevezése „Orgelase”) a bivaly piócák *Hirudinariinae* alcsaládjának (ez magába foglalja a *Hirudinaria*, *Illebdella*, *Poecilobdella*, *Sanguisoga* nemzetségeket) fajaiból (*Poecilobdella granulosa*) leírásra került az EP 0 193330 azonosítószámú európai szabadalomban.

A hialuronidázoknak sok gyakorlati *in vivo* és *in vitro* alkalmazásuk van. Hialuronidáz intravénás beadását javasolták miokardiális infarktus kezelésére [Kloner és mtsai.: *Circulation* 58 220 (1978); Wolf és mtsai.: *Am. J. Cardiol.* 53 941 (1984); Taira és mtsai.: *Angiology* 41 1029 (1990)]. A miokardiális infarktus a nem-mechanikus eredetű sérülések egy közös formáját képviseli; nevezetesen súlyos sejtkárosodás és sejthalál, amelyet ebben az esetben a sejtes hipoxia hirtelen fellépése okoz. Patkányokban előidézett kísérletes miokardiális infarktus esetében [Waldenström és mtsai.: *J. Clin. Invest.* 88 1622 (1991)] a sérült (infarktus érte terület) szívizom HA tartalma 24 órán belül megemelkedett, hogy 3 nappal később a normál szint csaknem háromszorosát érje el és ehhez intersticiális ödéma társult. Az infarktus érte területek relatív víztartalma ugyancsak progresszív módon megemelkedett, a 3. napra maximum értéket elérve és nagymértékben korrelációt mutatott a HA felhalmozódással. A megnövekedett HA tartalom és az ödéma hasonló kapcsolódását figyelték meg kísérletes szív és vese transzplantátum kilökődés során [Hällgren és mtsai.: *J. Clin. Invest.* 85 668 (1990); Hällgren és mtsai.: *J. Exp. Med.* 171 2063 (1990)], humán vese transzplantátumok kilökődése során [Wells és mtsai.: *Transplantation* 50 240 (1990)], tüdő betegségekben [Bjermer és mtsai.: *Brit. Med. J.* 295 801 (1987)] és idiopátiás intersticiális fibrózisban [Bjermer és mtsai.: *Thorax* 44 126 (1989)]. Az összes ilyen tanulmány nem csak bizonyítékot szolgáltat a megnövekedő HA szintre akut gyulladás esetében, de bizonyítja szerepét a

szöveti duzzadásért elsősorban felelős és a szív mechanikai és elektro-fiziológiai funkcióit befolyásoló lokális folyadék visszatartásban is.

Ezek az eredmények megmagyarázhatják a klinikai kísérletekben alkalmazott hialuronidázok működési mechanizmusát. Beszámoltak arról, hogy a hialuronidáz kezelés korlátozta a sejtkárosodást miokardiális iszkémia során patkányokban, kutyákban és emberben [Maclean és mtsai.: Science 194 199 (1976)]. A HA lebomlása követhető a szöveti víztartalom felgyülemlésének csökkenésével, a szöveti nyomásban bekövetkező csökkenéssel és végül a jobb perfúzióval.

Kimutatták, hogy a hialuronidázok és hasonlóképpen a hialuronidázt tartalmazó pióca extraktumok alkalmazhatók további terápiás célokra is. Így a hiáz terápia - önmagában, vagy ciklosporinnal kombinálva - meghosszabbodott graft túlélést eredményezett [Johnsson és mtsai.: Transplant Inter., nyomdában]. A hiázok (szétterjedést biztosító faktor, „spreading factor”) a legszélesebb értelmezés szerint alkalmazhatók a szövetek átjárhatóságának (permeabilitás) növelésére, hogy ezzel megnöveljük más farmakológiai ágensek (mint például citosztatikumokkal együtt alkalmazva rákos tumorok kezelésében) diffúzióját. Továbbá az is kimutatható, hogy a hialuronidázok jól alkalmazhatók tumor terápia során angiogenezis inhibitoroként működve és mint segédanyagok a tumorok kezelése során a lokális hatóanyag bejuttatás segítésében, a glaukóma és más szem rendellenességek kezelésében és mint más terápiás ágensek kiegészítője, mint például a helyi fájdalomcsillapítók és an-

tibiotikumok alkalmazása során. A terápiás alkalmazásra és hatásosságra általános áttekintés található Farr és munkatársai összefoglaló cikkében [Farr és mtsai.: Wiener Medizinische Wochenschrift 15 347 (1997)] valamint az ebben idézett irodalomban. Ezért tehát szükség van olyan aktív vegyületre, mint a hialuronidáz. Azonban az ismert és rendelkezésre álló hialuronidázok vagy nem stabilak - mint például a *Hirudo medicinalis*-ból származó hialuronidáz [Linker és mtsai.: J. Biol. Chem. 235 924 (1960); Yuki és Fischman: J. Biol. Chem. 238 1877 (1963)] - vagy meglehetősen alacsony specifikus aktivitást mutatnak [EP 0 193 330 lajstromszámú európai szabadalom; Budds és mtsai.: Comp. Biochem. Physiol. 87B(3) 497 (1987)]. Továbbá az ismert hialuronidázok egyike sem hozzáférhető rekombináns formában, amely létfontosságú követelmény az intenzív kereskedelmi alkalmazáshoz.

A találmányi leírásban első alkalommal kerül leírásra egy új hialuronidáz, amelyet *Hirudinaria manillensis*-ből izoláltunk és tisztítottunk és ugyanakkor az enzim rekombináns változatát is előállítottuk biotechnológiai módszerek segítségével.

Így a találmány tárgyát képezi a *Hirudinaria manillensis* pióca fajból izolált tisztított fehérje, amely olyan hialuronidáz biológiai aktivitását mutatja, amelynek aktivitását nem befolyásolja heparin és azzal jellemezhető, hogy molekulatömege a glikozilációtól függően 53-60 kDa között változik. Az új fehérje - amelyet manilláznak nevezünk - természetes formájában glikozilált, molekulatömege körül-

belül 58 kDa (± 2 kDa) és négy glikoformában létezik. Azonban a nem-glikozilált fehérje éppúgy a találmány tárgyát képezi, amely előállítható a cukor részegységek enzimes vagy kémiai hasításával, standard módszerek alkalmazásával. A találmány szerinti nem-glikozilált enzim molekulatömege körülbelül 54 ± 2 kDa, ahogyan ez SDS-PAGE segítségével meghatározható.

Közvetlen összehasonlítások azt mutatják, hogy az EP 0 193 330 lajstromszámú európai szabadalomban leközölt hialuronidáz („orgeláz”) azonos körülmények között körülbelül 28 kDa molekulatömeggel rendelkezik és sok szennyezőt tartalmaz, mint például hemoglobint.

A találmány szerinti természetes eredetű manilláz pH optimuma 6,0-7,0; izoelektromos pontja 7,2-8,0 értékek között található és aminosav szekvenciája a 7. ábrán ismertetett szekvencia.

Meglepő módon a preparatív tisztítási folyamat (lásd alább) során nyert manilláz különösen magas specifikus aktivitást mutat - 100-150 - előnyösen 110-140 (WHO) kU/mg fehérje, míg az orgeláz specifikus aktivitása körülbelül csupán 1,2 kU/mg. Továbbá az orgeláz pH optimuma alacsonyabb (5,2-6,0) a manillázzal összehasonlítva. A manillázra nincs hatással a heparin, ugyanúgy mint az orgeláz esetében.

Továbbá a találmány tárgyát képezi egy manilláz izolálására és tisztítására szolgáló eljárás, amelynek során az alábbi lépéseket hajtjuk végre:

- (i) a *Hirudinaria manillensis* fajba tartozó piócák fej-
részeit savas pufferben homogenizáljuk és lecentrifugáljuk;
- (ii) az (i) lépésben kapott felülúszót ammónium szulfát
segítségével precipitáljuk;
- (iii) kationcserélő kromatográfiát végzünk;
- (iv) konkanavalin-A affinitás kromatográfiát végzünk;
- (v) hidrofób kölcsönhatás kromatográfiát végzünk;
- (vi) affinitás kromatográfiát végzünk hialuronsav frag-
mensekkel bevont mátrixon;
- (vii) gél permeációs kromatográfiát végzünk; és kívánt
esetben
- (viii) a tisztított fehérjét enzimesen vagy kémiai úton
deglikoziláljuk.

A fentebb leírt folyamat lépések biztosítják, hogy a találmány szerinti fehérjét ilyen magas biológiai enzimaktivitással lehet előállítani. Ezért tehát a találmány tárgyát képezi továbbá egy olyan fehérje, amely aktivitásában heparinnal nem befolyásolt hialuronidáz biológiai aktivitásával rendelkezik és molekulatömege a glikozilációtól függően 53-60 kDa között változik; és ez a fehérje a fentebb leírt valamint az igénypontokban ismertetett folyamat lépéseivel állítható elő és amelynek specifikus enzimaktivitása előnyösen nagyobb mint 100 kU/mg fehérje. A leírás során az „egység” kifejezés alatt nemzetközi egységeket (IU) értünk.

A találmány tárgyát képezi egy eljárás rekombináns manilláz előállítására, amelynek során megfelelő DNS molekulákat, vektorokat és transzformált gazdasejteket alkalmazunk. Ennek következtében a találmány tárgyát képezi a ter-

mészetes eredetű manilláz tulajdonságaival rendelkező fehérjét kódoló DNS szekvencia.

Az is kimutatható, hogy legalább három további, kismértékben eltérő DNS szekvenciájú klón választható ki, amelyek manilláz (hialuronidáz) tulajdonságokkal rendelkező fehérjéket kódolnak, amelyek aminosav szekvenciái kismértékben eltérők.

A specifikált klónok a 8., 9. és 10. ábrákban bemutatott DNS szekvenciákkal rendelkeznek (felső szekvenciák), és ezen DNS szekvenciák éppúgy a találmány tárgyát képezik, mint az ezen szekvenciákat tartalmazó expressziós vektorok és az ezen vektorokkal transzformált gazdasejtek.

Továbbá a találmány tárgyát képezi a hialuronidáz biológiai aktivitásával rendelkező rekombináns fehérje, amelynek molekulatömege a glikozilációtól függően 55-59 kDa között változik és a 8., 9. és 10. ábrákban bemutatott aminosav szekvenciák (alsó szekvenciák) bármelyikével rendelkezik, vagy az ezen szekvenciákkal legalább 80% homológiát mutató szekvenciával rendelkezik. A leírás során a „manilláz” kifejezés alatt értjük mindazon fehérjéket, amelyek a fentebb meghatározott tulajdonságokkal rendelkeznek.

A természetes eredetű és hasonlóképpen a rekombináns fehérjék alkalmazhatók gyógyszerként, amely a pácienseknek közvetlenül vagy gyógyhatású készítmények formájában alkalmazhatók. Így a találmány tárgyát képezi továbbá a leírás szerinti rekombináns vagy természetes eredetű fehérje amely alkalmazható gyógyszerként, valamint alkalmazható a fehérjét és egy gyógyszerészetileg elfogadható hígítót, hordozót

vagy excipienst tartalmazó megfelelő gyógyhatású készítményben.

A találmány szerinti gyógyhatású készítmény továbbá tartalmazhatja más, aktív gyógyhatású vegyületek széles körét. Előnyösen alkalmazhatók azon véralvadásgátlók, amelyek nem gátolják vagy befolyásolják a találmány szerinti fehérje biológiai és farmakológiai aktivitását. Ilyen véralvadásgátlók lehetnek például a következők: heparin, hirudin vagy dikumarin, előnyösen heparin. Így tehát a találmány tárgyát képezi olyan gyógyhatású készítmény, amely további farmakológiailag aktív vegyületet, előnyösen heparint tartalmaz.

A humán vagy az állatgyógyászatban történő alkalmazással kapcsolatban a találmány szerinti fehérje előnyösen mint szétterjedést elősegítő ágens (terjedési faktor, „spreading factor”) működik, vagy elősegíti az átjutást a szöveten és a bőrön keresztül. Így a manilláz alkalmazható, mint további anyagok (mint például helyi érzéstelenítő) kiegészítője, például a tumorok kemoterápiája területén, akut miokardiális iszkémiával vagy infarktussal kapcsolatos rendellenességek és betegségek kezelésében, glaukóma és más szem rendellenességek kezelésében - például a fiziológiai folyadékok keringésének javításában a szemben - bőr és szövet graftok kezelésében, hogy megszüntessük a vértolulásokat és javítsuk a keringést; mint hatóanyag bejuttatási rendszer a bőrön, membránokon, további szöveteken keresztül; az egyes patogén mikroorganizmusokat vagy bizonyos tumorokat és rákos szöveteket körülvevő hialuronsav kapszula

eltávolítására; valamint az angiogenezis inhibitoraként, amely alkalmazható mint trombózis elleni és anti-tumor ágens.

Ezért tehát a találmány tárgyát képezi a manilláz leírás szerinti alkalmazása, közelebbről meghatározva miokardiális, kardiovaszkuláris és trombózisos rendellenességek és tumorok kezelésére alkalmas gyógyszerek előállítására során.

A leírás szerint a „gyógyszerészetileg elfogadható hordozó” kifejezés alatt közömbös, nem toxikus szilárd vagy folyékony töltőanyagot, hígítót vagy kapszulázó anyagot értünk, amely nem reagál hátrányos módon az aktív vegyülettel vagy a páciensben. Megfelelő, előnyösen alkalmazható folyékony hordozók a technika állása szerint jól ismertnek tekinthetők fel, mint például steril víz, fiziológiás sóoldat, vizes dextróz, cukor oldatok, etanol, glikolok és olajok, beleértve kőolaj, állati, növényi vagy szintetikus eredetű olajokat, mint például földimogyoró olaj, szójaolaj és ásványi olaj.

A találmány szerinti formulázások bejuttathatók mint egység dózisok, amelyek olyan hagyományos nem-toxikus gyógyszerészetileg elfogadható hordozókat, hígítókat, adjuvánsokat és vehikulumokat tartalmaznak, amelyek tipikusan alkalmazásra kerülnek parenterális bejuttatás esetén.

A leírás során a „parenterális” kifejezés alatt egyaránt értünk szubkután, intravénás, intra-artikuláris és intratracheális injekciókat és infúziós módszereket. Ugyanakkor további bejuttatási módok - mint például orális be-

juttatás és helyi alkalmazás - is megfelelők. A parenterális készítmények és kombinációk legelőnyösebben intravénásan adhatók be, akár bolus formájában, akár folyamatos infúzió során, az ismert eljárásoknak megfelelően. Az orális bejuttatásra szánt tabletták és kapszulák tartalmazhatnak hagyományos excipienseket, mint például kötő ágensek, töltőanyagok, hígítók, tablettázó anyagok, kenőanyagok, szét- esést biztosító anyagok és nedvesítőszer. A tabletták bevonhatók a technika állása szerint ismert módszereknek megfelelően.

Orális bejuttatásra szánt folyékony készítmények lehetnek vizes vagy olajos szuszpenziók, oldatok, emulziók, szirupok vagy elixírek formájában, vagy előállíthatók mint száraz termékek, amelyek az alkalmazást megelőzően vízzel vagy más megfelelő hordozóval kiegészíthetők. Az ilyen folyékony készítmények tartalmazhatnak hagyományos kísérőanyagokat, mint például szuszpendáló szereket, emulgeáló szereket, nem-vizes hordozókat és tartósítószeret. A helyi alkalmazásra szánt készítmények lehetnek vizes vagy olajos szuszpenziók, oldatok, emulziók, zselék vagy előnyösen emulziós kenőcsök formájában.

A találmány szerinti egység dózisok tartalmazhatják a találmány szerinti fehérje napi szükséges mennyiségeit vagy annak leosztott dózisait, amelyből a kívánt dózis összeállítható. Az optimális terápiásan elfogadható adagolás és dózis mennyiség adott páciens esetében (emlősök, beleértve embereket) különböző faktoroktól függ, mint például az alkalmazott specifikus aktív anyag aktivitásától, kortól,

testtömegtől, általános egészségi állapottól, nemtől, étrendtől, a beadás idejétől és módjától, a kiürülés sebességétől, enzimaktivitástól (egység/mg fehérje), a kezelés céljától - azaz például terápia vagy megelőzés - és a kezelendő betegség természetétől.

Ezért tehát olyan készítmények és kombinációk esetében, mint heparin-szerű véralvadás gátlókkal kezelt páciens esetében (*in vivo*) a találmány szerinti fehérje (manilláz) gyógyszerészetileg hatékony napi dózisa a körülbelül 0,01 és 100 mg/kg testtömeg közötti tartományba esik (100 kU/mg specifikus aktivitás alapján számolva), előnyösen 0,1 és 10 mg/kg testtömeg közötti tartományba esik. A bejuttatás módja szerint egyetlen dózis 0,5 és 10 mg közötti mennyiségű manillázt tartalmazhat.

A heparin koncentrációja például amikor manillázzal együtt kerül beadásra, tipikus esetben 500-4000 egység (IU) egy napra, azonban kívánt esetben növelhető vagy csökkenthető.

A találmány szerinti manilláz tisztítását a példákban részletesen leírt módon végeztük. Az 1. táblázat a manilláz preparatív tisztítási vázlatát mutatja be. A 2. táblázat mutatja be a találmány szerinti fehérje feldúsításának folyamatát és a 3. táblázat mutatja be a manilláz összehasonlítását ismert pióca eredetű hialuronidázokkal.

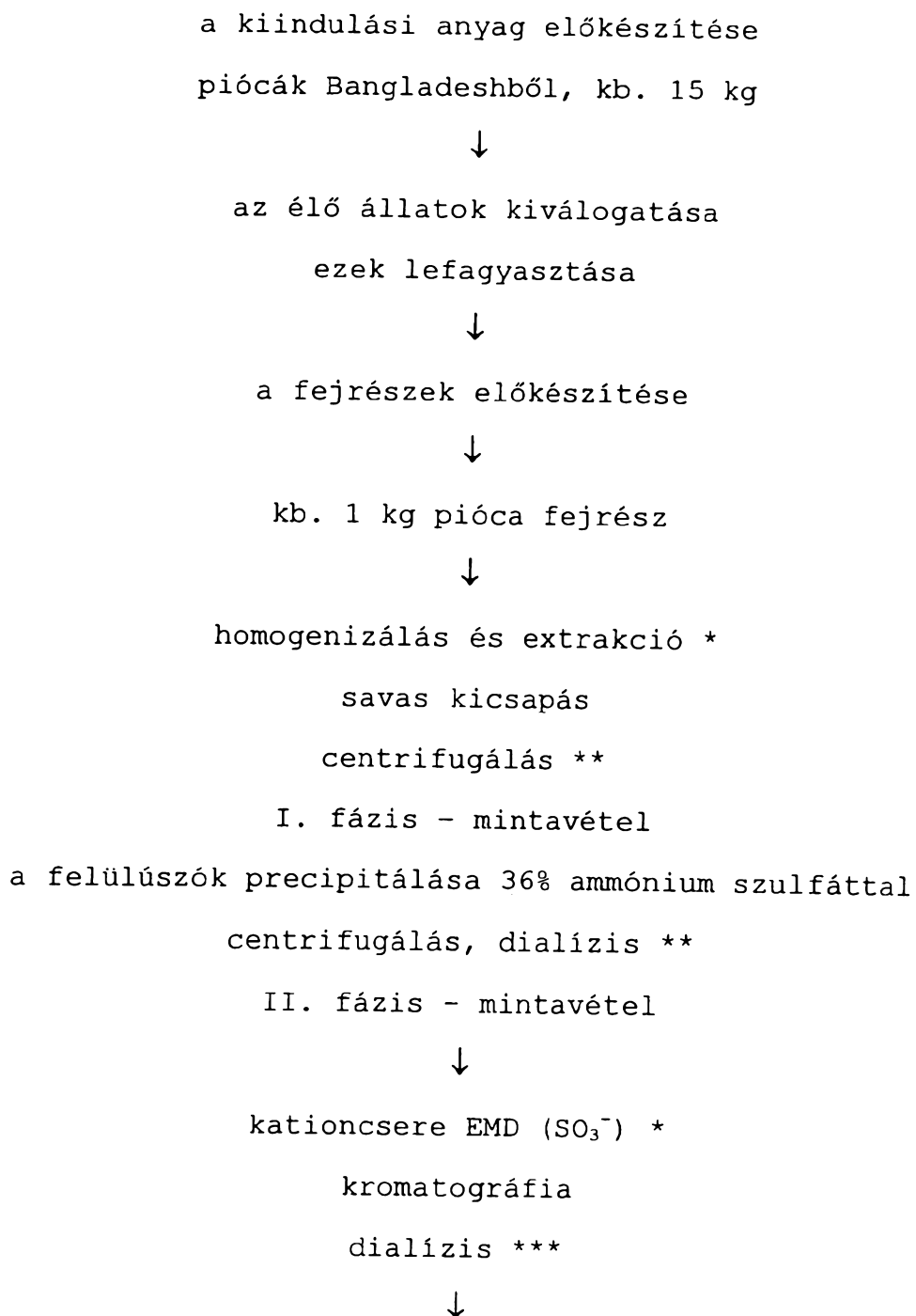
Egy hialuronsavat hasító manilláz elnevezésű enzimet izoláltunk *Hirudinaria manillensis* piócák fejrészből és homogenitásig tisztítottuk. Ezt a hialuronidázt savas extrakció, ammónium-szulfátos kicsapás segítségével tisztí-

tottuk, amelyet ezután kationcserélő, Concanavalin-A-Sepharose, Propyl-Fractogel, hialuronán-fragmens-Sepharose és Diol-LiChorosphere oszlopokon végzett kromatográfia követett. A hialuronán fragmenseket a természetes eredetű hialuronán hasításával állítottuk elő, marha here hialuronidázt alkalmazva. A fragmensek tisztítása és jellemzése után az affinitás mátrixok előállítását az alább leírtak szerint végeztük. Ez az első eset, hogy ilyen affinitási mátrixokat alkalmaztak a hialuronidáz tisztítására. Ez a nagy hatékonyságú kromatográfia a hialuronán kötő fehérjék gyors és hatékony tisztításának egyik eszköze. Az enzim aktivitás visszanyerése a tisztítás egyes lépései után meglehetősen magas volt. A három független preparatív tisztítás eredményei összevethetők voltak. Ezek során magas aktivitású mintákat kaptunk, amelyek 20-160 kU/mg közötti specifikus aktivitást mutattak, a tisztítás fokától függően. Összehasonlító kísérletek során ismert hialuronidázokat izoláltunk a technika állása szerint ismert módokon és tulajdonságaikat összehasonlítottuk a találmány szerinti fehérje tulajdonságaival (3. táblázat).

Az 1. táblázatban bemutatott vázlat szerint tisztított hialuronidáz különbözik a más szerzők által leírt többi pióca hialuronidáztól. Hasonló molekulatömeget kaptunk nem disszociáltató körülmények során (semmi β -merkaptoetanol), ami arra utal, hogy a manilláz egyetlen alegységből álló enzim, ami közös az emlős forrásokból származó hialuronidáz készítmények széles skálájában. Ez a végső készítmény egy egyetlen alegységből álló enzim (1. ábra), amelynek MALDI

segítségével meghatározott látszólagos molekulatömege 58 ± 2 kDa és izoelektromos pontja 7,2-8,0 között van.

1. táblázat: Manilláz preparatív tisztítása





Propyl-Fractogel kromatográfia *

dialízis ****



hialuronsav fragmensek (HA) affinitás kromatográfia

dialízis ****



Diol-LiChrospher	→ 140.000 WHO
kromatográfia ****	egység

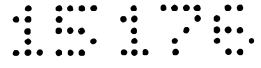


fordított fázisú kromatográfia

analitikai *****

2. táblázat: Manilláz tisztítása (dúsítás) 1 kg pióca fejrészből kiindulva.

tisztítási lépés	összes fehérje mg	összes aktivitás kU	visszanyerés %	specifikus aktivitás U/mg	tisztítás mértéke
I. fázis felülúszó extrakció és savas ki- csapás után	31700	633,3	100	20	1
II. fázis felülúszó 36% ammónium szulfát precipitáció után	9530	443,3	70	45	2,25
kationcserés kromatográfia	426,7	332,5	52,5	770	38,5
Con-A affinitás kromatográfia	41,0	166,2	26,2	4000	200
Propyl-Fractogel kromatográfia	11,9	133,0	21,0	11000	550
hialuronsav fragmentek - Sepharose affinitás kromatográfia	1,9	66,4	10,5	35000	1750
Diol-LiChrospher	0,307	33,2	5,2	108000	5400



3. táblázat: A manilláz összehasonlítása ismert pióca hialuronidázokkal.

	<u>"manilláz"</u> <i>Hirudinaria</i> <i>manillensis</i> találmány szerint	<u>hialuronidáz</u> <i>H. medicinalis</i> összehasonlító kísérlet	<u>hialuronidáz</u> <i>H. medicinalis</i> [Linker és mtsai.: J. Biol. Chem. (1960)]	orgeláz P. granulosa EP 0 193 330 [Budds és mtsai.]
specifikus akti- vítás	140000	kb. 20000 félig megtisztít- tott	≤ 100	≤ 100
WHO (IU) egység/mg				
homogenitás SDS-PAGE MALDI	1 fehérje homogén 4 glikoforma	fehérjék keveréke	eredmények nem állnak rendelkez- zésre	sok fehérje keve- réke fő szennyező: hemoglobin
molekulatömeg	$58,3 \pm 2$ kDa	n.d.	nincs közlés	$28,5 \pm 3$ kDa
aminosav szekven- cia	meghatározva	n.d.	nincs közlés	nem került meg- tárolásra
pH optimum	6,0-7,0	6,0-7,0	nincs közlés	5,2-6,0
pI	7,5-8,0	n.d.	n.d.	n.d.



hidrofóbitás	kötődik Propyl-HIC mátrixhoz 2 M ammónium szulfát jelenlétében	nem kötődik Propyl-HIC mátrixhoz 2 M ammónium szulfát jelenlétében		
aktivitás csökkenés heparinnal	nincs hatás	nem került megváltoztatásra	nincs hatás	nincs hatás
stabilitás +4 °C-on	stabil 7 nap után kb. 75% aktivitás megmarad	instabil 7 nap inkubálás után 100% aktivitás vesztes		
stabilitás +37 °C-on	stabil 7 nap után kb. 60% aktivitás megmarad	instabil 7 nap inkubálás után 100% aktivitás vesztes		viszonylag stabil
stabilitás +37 °C-on, kutya szérumban jelenlétében	stabil 7 nap után kb. 100% aktivitás megmarad	instabil 1 nap inkubálás után 100% aktivitás vesztes	nincs közlés	nem vizsgált

A csillagok a táblázatokban (* - *****) az aktivitás meghatározásáról és a biokémiai jellemzésről adnak információt.

Az aktivitás meghatározásának és a biokémiai jellemzésnek az alkalmazott módszerei a manilláz koncentrációjától függenek az analizált mintákban. Ennek következtében ezeket egymást követően a megfelelő módszerekkel egészítettük ki a tisztítás egymást követő lépéseiben.

* - aktivitás meghatározás - turbiditás csökkentési vizsgálat

** - aktivitás meghatározás - turbiditás csökkentési vizsgálat

- fehérje tartalom meghatározás (E_{280} , Pierce BCA módszer)

- SDS-PAGE (SDS - poliakrilamid gél elektroforézis)

- hemoglobin meghatározás

*** - aktivitás meghatározás - turbiditás csökkentési vizsgálat

- fehérje tartalom meghatározás (E_{280} , Pierce BCA módszer)

- SDS-PAGE - Western blott (anti-humán hemoglobin antitest)

**** - aktivitás meghatározás - turbiditás csökkentési vizsgálat

- fehérje tartalom meghatározás (E_{280} , Pierce BCA módszer)

- SDS-PAGE - Western blott anti-humán hemoglobin

antitest

- SDS-PAGE - Western blott anti-Con-A antitest
- SDS-PAGE - Western blott - anti-peptid antites-
tek

- MALDI
- fehérje tartalom meghatározás (Pierce BCA mód-
szer)
- SDS-PAGE - Western blott - anti-peptid antites-
tek

A manilláz konkanavalin-A-hoz történő kötődése azt mutatja, hogy ez a hialuronidáz egy glikoprotein, amelynek cukor komponenseit α -D-mannopiranozil vagy α -D-glükopiranozil és ezzel sztérikusan rokon molekularészlet zárja le. A manilláz-aktivitással rendelkező minták SDS-PAGE analízisben két sávot mutattak, csaknem azonos RF értékekkel. Hosszabb SDS-PAGE gélt és eltérő futási körülményeket alkalmaztunk a sávok jobb elválasztása érdekében. Ezekben a kísérletekben két további, gyengébb sáv volt kimutatható (2. ábra). Mindegyik esetében az N-terminális részt (30 aminosav) egyenként szekvenáltuk és ismét nem találtunk eltérést az N-terminálison. Endo-F-glikozidázzal (PNGase) végzett deglikozilációt követően azt figyeltük meg, hogy mind a négy sáv egyetlen sávot adott, amelyben a molekula-tömeg csökkenés 3 kDa volt. Ennek következtében nagyon valószínű, hogy az elektroforetikus mozgékonyágban megfigyelt különbségek a manilláz molekulák eltérő glikozilációs mintázatának köszönhetőek. A neuraminidáz, O-endo-glikozidáz

és neuraminidáz plusz O-glikozidáz kezeléseknek nem volt hatása a tisztított enzim molekulatömegére (3. ábra). Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a manilláz legalább egy N-kapcsolt oligoszacharid láncot tartalmaz. Az O-kapcsolt szénhidrát láncok nem mutathatók ki az alkalmazott módszerrel.

Bezáró tisztítási lépésként az RP-kromatográfiát végeztük el. Bár az enzimaktivitást tovább már nem lehetett kiutatni, a sókat és a peptid proteáz inhibitorokat el lehetett távolítani (4. ábra). A fehérjét tartalmazó frakciókat tovább jellemeztük MALDI segítségével. A MALDI segítségével meghatározott manilláz molekulatömeg 58,3 kDa volt.

A heparinnak nincs hatása ezen hialuronidáz aktivitására (5. ábra). A manilláz sokszorosan stabilabb, mint a *Hirudo medicinalis* hialuronidáz (6. ábra). Továbbá, a részlegesen tisztított manilláz minták nagyon magas stabilitást mutattak kutya és patkány plazmában a -20 °C és +37 °C tartományban.

A HA-affinitás mátrixok elkészítése az irodalomban már közlésre került [Tengblad: Biochim. Biophys. Acta 578 281 (1979)]. Ezt a HA-mátrixot alkalmaztuk a kötőszöveti hialuronát kötő fehérjék vagy az ugyanezen forrásból származó proteoglikán fehérje-keratán szulfát mag tisztításában [Christner: Anal. Biochem. 90 22 (1978)]. Az ezen affinitási mátrix segítségével tisztított HA-kötő fehérjét (HABP) a továbbiakban hisztokémiai tanulmányok során alkalmaztuk, amelyek a hialuronát receptorok [Green és mtsai.: J. Cell Science 89 145 (1988); Chan és mtsai.: J. Cell. Biol. 107

289 (1997)] vagy a hialuronán [Waldenström és mtsai.: J. Clin. Invest. 88 1622 (1991); Waldenström és mtsai.: Eur. J. Clin. Invest. 23 277 (1993)] eloszlására irányultak a szövetekben.

Azonban ezen gél laboratóriumunkban kifejlesztett elkészítési módszere lehetővé teszi, hogy pontosan meghatározott HA-fragmens koncentrációjú géleket állítsunk elő (1 és 15 mg/ml között). Ez viszont lehetővé teszi, hogy ilyen géleket ne csak a hialuronán-kötő fehérjék tisztítására használjunk fel, hanem ezek elválasztására is, ezek eltérő hialuronánnal szemben megnyilvánuló affinitását kihasználva. Ez a szelektív elválasztás szabályozható különböző hosszúságú HA-fragmensek alkalmazásával. Az ilyen elválasztás lehetővé teszi, hogy sok biológiai fontosságú receptort (például az onkológiában) jobban tudjunk jellemezni.

Az itt leírt módszer szerint előállított HA-mátrixok a következő esetekben alkalmazhatók:

- (1) ismert HA-kötő fehérjék tisztítása;
- (2) ismeretlen HA-kötő fehérjék tisztítása;
- (3) új HA-kötő fehérjék azonosítása;
- (4) hialuronidázok tisztítása.

A találmány szerinti eljárás segítségével kapott HA-fragmensek jellemezhetők modern analitikai módszerek alkalmazásával (NMR, MALDI-MS) és alkalmazhatók a fehérje-fehérje kölcsönhatások kutatásában. Továbbá, ezek a fragmensek alkalmazhatók az angiogenezis és a neo-vaszkularizációs folyamatok kutatása során.

Az 1. ábra: A fehérje standard, manilláz minta (Diol-LiChrospher kromatográfia után) SDS-poliakrilamid gél elektroforézise (SDS-PAGE - CBB festés).

- 1 - széles tartományú fehérje standard;
- 2 - manilláz, 4 µg;
- 3 - orgeláz, 6 µg;
- 4 - hemoglobin, 40 µg.

A 2. ábra: (a) SDS-PAGE (CBB festés) és

(b) SDS-PAGE - Western blott négy manilláz-aktív mintán (3-6 sávok) HA-affinitás kromatográfia után. Nyúl P3-2A poliklonális peptid-elleni antitestet alkalmaztunk ebben a kísérletben.

A 3. ábra: SDS-PAGE (CBB) a következő mintákból:

- 1 - LW-MM - alacsony móltömegű marker (BioRad);
- 2 - manilláz;
- 3 - N-glikozidáz F (PNGase F);
- 4 - manilláz PNGase F kezelés után;
- 5 - manilláz O-glikozidáz kezelés után;
- 6 - manilláz O-glikozidáz és neuraminidáz kezelés után;
- 7 - O-glikozidáz és neuraminidáz;
- 8 - molekulatömeg marker (MWM-előre festett, BioRad).

A 4. ábra: Fordított fázisú kromatográfia a következő mintákkal:

- (a) ribonukleáz standard;
- (b) manilláz minta (specifikus aktivitás 140 kU/mg).

Az 5. ábra: Heparin hatása a manilláz (- o -) hialuronidáz aktivitására és a marha here hialuronidáz aktivitására (- • -).

X-tengely: IU heparin; Y-tengely: visszamaradó % aktivitás.

A 6. ábra: Hialuronidázok stabilitás mérése pufferben és plazmában:

(a) manilláz (4 °C);

(b) manilláz (-20 °C);

(c) manilláz (37 °C);

(d) marha here hialuronidáz (Y) és *Hirudo medicinalis* hialuronidáz (A).

X-tengely: inkubálás napokban; Y-tengely: WHO (IU) egységek.

A 7. ábra: Természetes eredetű manilláz aminosav szekvenciája, amelyet a találmány szerinti, *Hirudinaria manillensis*-ből izolált és tisztított fehérje szekvenálásával kaptunk (megfelel az 1. azonosítási szám szerinti szekvenciának).

A 8. ábra: Egy rekombináns manilláz klón (21. klón) nukleotid (felső vonalak) és aminosav szekvenciája (megfelel a 2. és 3. azonosítási szám szerinti szekvenciáknak).

A 9. ábra: Egy rekombináns manilláz klón (31. klón) nukleotid (felső vonalak) és aminosav szekvenciája (megfelel a 4. és 5. azonosítási szám szerinti szekvenciáknak).

A 10. ábra: Egy rekombináns manilláz klón (31. klón) nukleotid (felső vonalak) és aminosav szekvenciája (megfelel a 6. és 7. azonosítási szám szerinti szekvenciáknak).

A 11. ábra: *E. coli* expressziós vektor manillázhoz.

A 12. ábra: Bakulo donor plazmid manillázhoz.

A 13. ábra: Élesztő expressziós vektor manillázhoz.

A találmányt az alább következő példák segítségével részleteiben is bemutatjuk. Azonban felhívjuk a figyelmet arra, hogy ezek a példák csupán a találmány jobb megérthetőségét szolgálják és nem korlátozzák a találmányt a bemutatott általános anyagokra, módszerekre, fizikai paraméterekre, vegyületekre, biológiai anyagokra, expressziós vektorokra, gazdaszervezetekre, stb., amelyeket a kísérletek során alkalmaztunk és a példákban jeleztünk. Amennyiben másként nem jelezzük, a technika állása szerint jól ismertnek feltételezhető standard módszereket és az általában hozzáférhető anyagokat alkalmaztuk.

1. példa

Általános megjegyzések

Számos előzetes kísérlet végeztünk el *Hirudinaria manillensis* nyers extraktumokat felhasználva, annak érdekében, hogy megalapozzuk a tisztítási folyamatot. A következő módszereket választottuk ki és ellenőriztük: ammónium-szulfátos kicsapási eljárás, kation- és anioncserés kromatográfia, affinitás kromatográfia Heparin-Fractogel, Con-A-Sepharose alkalmazásával, hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia (HIC) Octyl-Sepharose, Propyl-, Phenyl-, Butyl-Fractogel alkalmazásával, preparatív izoelektromos fókuszálás és preparatív elektroforézis.

Az eredmények azt mutatták, hogy savas és ammónium-szulfátos kicsapás, kationcserés, Con-A-Sepharose, Propyl-Fractogel HIC és Diol-LiChrospher, valamint hialuronsav fragmens - Sepharose (HA-Sepharose) kromatográfia alkalmas a manilláz tisztítására. A laboratóriumunkban elkészített

HA-Sepharose mátrixot sikeresen tudtuk felhasználni ezen glikozidáz tisztításában.

Az összes műveletet hidegen végeztük, amennyiben más-ként nem jelezzük. A tisztítást a fentebb bemutatott vázlat alapján végeztük (1. táblázat).

2. példa

A kiindulási anyag előkészítése a tisztításhoz; pióca fejrészek előkészítése

Bangladeshben gyűjtött *Hirudinaria manillensis* piócákat azonnal és pillanatszerűen lefagyasztottunk és utána -40 °C és -80 °C között tároltuk. A piócák fejrészét fagyasztott állapotban levágtuk, a fejrészek tömege a testtömeg körül-belül 5 százalékát tette ki.

3. példa

Manilláz extrakciós eljárás a pióca fejrészekből kiin-dulva

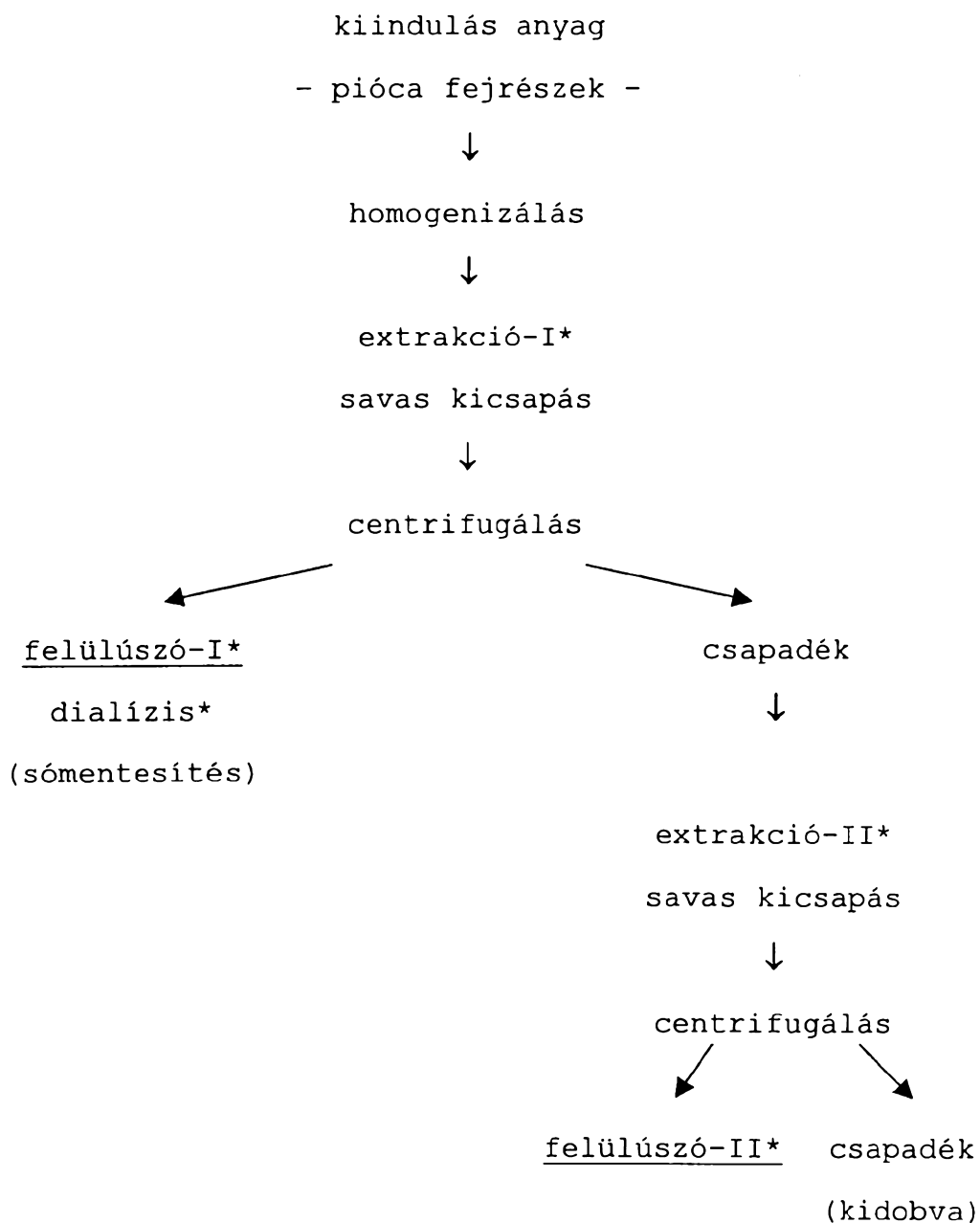
Egy példaként szolgáló tisztítás során 1 kg fagyasztott pióca fejrészt homogenizáltunk Waring Blender segítségével 2500 ml hideg 0,1 M ecetsav pufferben (pH 4,0), amely 0,025% timerozált és 17 mg/ml trehalózt (Merck KGaA, kat. szám: 1.08216) tartalmazott. A homogenátumot óvatosan ke-vertettük és a következő proteáz inhibitorokat adtuk hozzá azonnal:

1. PMSF	1,7 mg/ml	10,0 mM
2. Leupeptin	10,0 µg/ml	20,0 µM
3. Pepstatin-A	0,7 µg/ml	1 µM
4. EGTA	380,35 µg/ml	1,0 mM
5. p-APMSF	40,0 µg/ml	20,0 µM

A keverést 4 órán keresztül végeztük hidegen majd lecentrifugáltuk (4900 ford/perc, 20 percig). A felülúszó oldatot (felülúszó-I) összegyűjtöttük és összeöntöttük a felülúszó-II oldattal, amelyet az első centrifugálás után a szöveti csapadék extrakciójából kaptunk.

Az összeöntött felülúszók képezik az 1. fázis anyagát.

Az eljárást az alábbi vázlat foglalja össze:



* A minták aktivitásának meghatározását és biokémiai jellemzését aktivitás meghatározó - turbiditás csökkenési vizsgálat valamint fehérje tartalom meghatározás segítségével végeztük (E_{280} , Pierce BCA módszer, SDS-PAGE).

Nem volt lehetséges az enzim aktivitás meghatározása a pióca homogenizátumban a hemoglobinok nagyon nagy mennyisége (amelyet a Merck KGaA 13851 katalógus számú hemoglobin meghatározási reagenskészlet segítségével mértünk) és más fehérjék miatt. Továbbá a hialuronidáz aktivitás nem mérhető meg a savas kicsapást megelőző fázisban. A végső specifikus aktivitások (aktivitás per mg fehérje) ezen extraktumokban körülbelül 10-30 WHO egységet adtak. Az SDS-PAGE szerint a nyers extraktum nagymennyiségű különböző fehérjét tartalmazott, ezek közül a fontosabbak molekulatömege körülbelül 120, 55-60, 45, 31, 28, 22, 15 és 14-10 kDa volt.

4. példa

Ammónium szulfát precipitációs eljárás az I. fázisú anyaggal

Ezt követően az ammónium-szulfát precipitációs eljárást választottuk ki, mint első lépést a manilláz tisztítása során és ez körülbelül 5-szörös dúsítását eredményezte ennek az enzimnek.

Az enzimesen közömbös anyagot az I. fázisú nyers extraktumból szilárd ammónium-szulfát (Merck KGaA) fokozatos hozzáadásával - 36% koncentrációig (tömeg/térfogat) - precipitáltuk 4 °C-on. Ezt a keveréket 1 órán keresztül kevertük és lecentrifugáltuk. A csapadékot eldobtuk. A felúszót folyó ionmentesített vízzel szemben dializáltuk éj-

szakán át, majd 24 órán keresztül 20 mM foszfát pufferrel (pH 6) szemben. Ezen extraktumok végső specifikus aktivitásai körülbelül 40-150 WHO egység között voltak. SDS-PAGE szerint a II. fázisú extraktumok nagy mennyiségű különböző fehérjét tartalmaznak.

5. példa

Kationcserés kromatográfia

A kationcserélőt szakaszos adszorpciós módban alkalmaztuk. Egy enzim-gazdag dializált mintát (II. fázis) inkubáltunk éjszakán át 1 l Fractogel EMD SO_3^- 650 (S) kationcserélővel (Merck KGaA, kat. szám: 16882). Miután az inkubálást centrifugálással befejeztük, a kationcserélőt a pufferrel mostuk, újra lecentrifugáltuk és a géllal HPLC-Superformance oszlopot töltöttünk meg. Miután az oszlopot 20 mM foszfát pufferrel (pH 4,9) mostuk, a kötött fehérjéket az oszlopról ugyanezen nátrium-foszfát pufferrel (pH 6,0) eluáltuk, a puffer 0-1 M NaCl koncentráció között lineáris gradienst tartalmazott. Frakciókat gyűjtöttünk minden 3 percben (9 ml) és az abszorbanciát 280 nm hullámhossznál követtük. A manilláz 0,15-0,18 M NaCl koncentrációnál eluálódott. Megmértük az összes frakció aktivitását és fehérje tartalmát, majd a frakciókat összeöntöttük és éjszakán át dializáltuk 20 mM foszfát pufferrel (pH 6,0) szemben, a puffer tartalmazott még nátrium-azidot és 17 mg/ml trehalózt.

Meghatároztuk a fehérjék koncentrációját, az összeöntött frakciók specifikus aktivitásait és SDS-PAGE analízist végeztünk. A nagyon jó kitermelések (aktivitás) és a nagy-

fokú specifikus aktivitás ellenére (WHO aktivitás egységek per mg fehérje, megfelel az IU-nak) még mindig sok fehérjéből álló keverék volt kimutatható a minták SDS-PAGE analízisének eredményei alapján. A Fractogel EMD SO_3^- 650 (S)® (Merck KGaA, Németország) segítségével végzett kationcserés kromatográfia körülbelül 10-50-szeres közötti, nagyon magas tisztítási faktort eredményezett. Ez a lépés nagyon hatékony a hemoglobin szennyeződések csökkentésében. Továbbá azt találtuk, hogy a szakaszos módszer nagyon hasznos kezdőlépés volt a II. fázisú felülúszó nagy térfogatainak (5-16 l) kezelésében.

6. példa

Concanavalin-A Sepharose affinitás kromatográfia

A kationcserélő után az enzimben gazdag egyesített frakciók további tisztítását Con-A lektin affinitás kromatográfia segítségével végeztük. A kereskedelemben beszerezhető Con-A-Sepharose-t (® Pharmacia Biotech, kat. szám: 17-0440-01) ecetsavas pufferrel mostuk (0,1 M + 0,5 M NaCl pH 8,0; 0,1 M bórsav + 0,1% Triton-X 100 pH 6,0) és végül 0,1 M ecetsavas pufferrel pH 6,0, amely tartalmazott még 0,5 M NaCl-t is. A mintát éjszakán át dializáltuk a következő pufferrel szemben: 20 mM ecetsavas puffer + 0,5 M NaCl + 1 mM CaCl_2 + 1 mM MgCl_2 + 1 mM MnCl_2 , pH 6,0, majd szobahőmérsékleten 1000 ml térfogatú Con-A oszlopra vittük és 2 órán keresztül eluáltuk a következő oldattal: 510 ml 100 mM ecetsav puffer + 0,5 M NaCl + 1 mM CaCl_2 + 1 mM MgCl_2 + 1 mM MnCl_2 , pH 6,0.

Ezt deszorpció követte, ugyanezen pufferben alkalmazott 0,5 M metil- α -D-mannopiranozid segítségével. Az elúciót folyamatosan nyomon követtük 280 nm hullámhossznál. A gyűjtött 3 ml-es frakciókat hialuronidáz aktivitásra vizsgáltuk. Az aktív frakciókat összeöntöttük és éjszakán át dializáltuk 20 mM foszfát pufferrel (pH 6,0) szemben, amely tartalmazott még nátrium-azidot és 17 mg/ml trehalózt. Végrehajtottuk az összeöntött frakciók fehérje koncentráció és specifikus aktivitás meghatározását valamint SDS-PAGE analízist végeztünk. Ez a lépés nagyon hatékony volt a hemoglobin maradékának az eltávolítására. A Con-A kromatográfia 4-10 közötti tisztítási faktort eredményezett. Ez a faktor a kiindulási anyag minőségének függvényében változott.

7. példa

Propyl Fractogel hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia

A hialuronidáz aktív Con-A összeöntött frakciókhoz ammónium-szulfátot adtunk 2 M végső koncentrációig. A mintákat ezután 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten 150 ml Propyl-Fractogellel (EMD Propyl 650 (S)® Merck KGaA, Németország, kat. szám: 1.10085), amelyet 2 M ammónium-szulfátot tartalmazó 0,1 M foszfát pufferrel (pH 7,0) hoztunk egyensúlyba. Az inkubálás befejezése után a gélt kétszer mostuk ugyanezen pufferrel és elkészítettük a 2,6 x 60 cm HPLC-Superformance oszlopot. A kötött fehérjéket 0,1 M foszfát pufferrel (pH 7,0) eluáltuk. 6 ml-es frakciókat gyűjtöttünk minden 3 percben, közvetlenül dializáltuk ionmentesített vízzel szemben (2-3 óra) majd ezt követően 20

mM foszfát pufferrel (6,0) szemben. A frakciókat hialuronidáz aktivitásra vizsgáltuk. Az aktív frakciókat összeöntöttük és éjszakán át dializáltuk 20 mM foszfát pufferrel (6,0) szemben, amely tartalmazott még nátrium-azidot és 17 mg/ml trehalózt is. Elvégeztük az összeöntött frakciók fehérje és aktivitás meghatározását.

Ebben a kromatográfiás lépésben a tisztítási faktor körülbelül 3-5 volt. A megelőző lépésben a hordozóról felszabadult kismennyiségű Con-A-t a többi fehérje szennyezővel együtt eltávolítottuk.

8. példa

Hialuronsav oligoszacharid affinitás oszlop elkészítése

(a) Hialuronán (HA) hidrolízise marha here hialuronidáz segítségével:

7 g hialuronsavat oldottunk fel 1,25 l 0,1 M nátrium-acetát pufferben, amely még a következőket tartalmazta: 0,15 M NaCl és 0,5 mM EDTA (pH 5,2), éjszakán át történő keveréssel 4 °C-on toluol jelenlétében. Ezt követően a HA-t tartalmazó oldat pH értékét 5,2-re állítottuk és 37 °C-ra melegítettük, majd marha here hialuronidázt (Merck KGaA, 700 WHO egység/mg) adtunk hozzá. 7 g HA-hoz 210 mg enzimet használtuk fel, amelyet közvetlenül a felhasználás előtt oldottuk fel 50 ml fenti pufferben. A hidrolízist 30 percig végeztük 37 °C-on folyamatos keverés közben és a leállításhoz a keveréket 5 percig melegítettük 100 °C-on forrásban levő vízfürdőben. A reakcióelegyet centrifugálás segítségével tisztítottuk (30 perc, 10.000 g), a denaturált fehérjét tartalmazó üledéket eldobtuk és a felülúszót 0,2 µm filte-

ren szűrtük keresztül, amelyre üvegszál as előszűrőt helyeztünk. A HA oligoszacharidokat (HAOS) tartalmazó tisztított oldatot szűrés segítségével frakcionáltuk különböző molekulatömeg levágási értékkel rendelkező három Diaflo ultraszűrő membránon keresztül (Amicon) az alábbiak szerint.

(b) HAOS frakcionálása ultraszűrés segítségével:

Az előző lépésből származó HAOS-t tartalmazó oldatot 30YM Diaflo ultraszűrő membránon szűrtük keresztül. A visszatartott oldatot félretettük további kísérletekhez, míg a szűrletet egy második ultraszűrésnek vetettük alá 10YM Diaflo ultraszűrő membránon keresztül. A visszatartott oldatot ismét félretettük további kísérletekhez, míg a 10YM membránon átjutott oldatot az utolsó ultraszűrésnek vetettük alá 3YM Diaflo ultraszűrő membránon keresztül. Ezt követően a HAOS-t tartalmazó visszatartott oldatot - az oldat körülbelül 10 millilitere - további tisztításokra használtuk fel. Ezt a frakciót - HAOS 3-10 - az alább következők szerint tisztítottuk és a továbbiakban a Sepharose-hoz történő kapcsolásra használtuk fel.

(c) HAOS 3-10 tisztítása:

A HAOS 3-10 frakciót Biogel-P2® oszlopon tisztítottuk (sómentesítettük). Ezt az oszlopot (4 cm x 100 cm) Biogel-2 Medium® 200-400 mesh (BioRad) mátrix-szal töltöttük meg és 5 oszloptérfogat vízzel mostuk (Milli-Q, Millipore). A megelőző lépésben kapott HAOS 3-10 frakciót (15 ml, 1,5 g oligoszacharid) vittük fel erre az oszlopra. Az oszlopot vízzel eluáltuk, 15 ml-es frakciókat gyűjtöttünk és a HA oligoszacharidok jelenlétére analizáltuk. Az oligoszacha-

ridot tartalmazó frakciók a sók előtt eluálódtak (ez utóbbiakat AgNO_3 segítségével mutattuk ki), ezeket összeöntöttük és ismét 3YM Diaflo membránon koncentráltuk.

(d) HAOS 3-10 analízise:

A Sepharose kapcsolási hatékonyságának meghatározására a gélt (azonos sarzs) mostuk és vízben felszuszpendáltuk, hogy 50 százalékos zagyot kapjunk. A Sepharose-HAOS 3-10 konjugátumból és a kontrollként alkalmazott Sepharose-ból 100 μl -es kisebb részleteket vettünk ki három párhuzamosban és 2,5 ml 2,2 N trifluor-ecetsavhoz (TFA, Merck KGaA) adtuk hozzá teflon csavaros tetejű csőben. A hidrolízishez a keveréket argonnal öblítettük és 100 °C-on inkubáltuk 16 órán keresztül. A hidrolízis végén a mintákat nitrogén alatt szárítottuk, vízben újra-szuszpendáltuk és glükózamin valamint uronsav meghatározására használtuk fel. Az uronsav és a glükózamin lebomlás mértékének meghatározásához az egyes hidrolízisek esetében ismert mennyiségű UA-t vagy GlcNAc-t tartalmazó kontroll mintákat is hozzávettünk és azonos körülmények között inkubáltuk.

A fentebb leírt körülmények között 5, 8, 9, 11 és 15 mg HAOS 3-10 mennyiségeket kapcsolunk 1 ml lecsurgatott Sepharose géllal két egymástól független kísérletben. Az eredmények az UA és glükózamin vizsgálati eljárásokon alapulnak.

(e) Alkalmazott vizsgálati eljárás:

Az uronsav tartalmat az analizált mintákban Bitter és Muir eljárása szerint határoztuk meg [Bitter és Muir: Anal. Biochem. 4 330 (1962)].

A hexózamin mennyiségeket Rondle és Morgan módszere segítségével analizáltuk [Rondle és Morgan: Biochem. J. 61 586 (1955)].

9. példa

Hialuronsav fragmensek Sepharose kromatográfia (HA-Sepharose kromatográfia)

A 8-10 mg/ml anyagot tartalmazó kromatográfiás mátrixokat készítettük el a fentebb leírtak szerint. Az enzimet tartalmazó mintát 0,15 M NaCl tartalmú 20 mM ecetsavas pufferrel (pH 4,0) szemben dializáltuk és a 25 ml térfogatú HA-Sepharose oszlopra felvittük. Ugyanezen pufferrel történő mosás után az elúciót a 20 mM koncentrációjú ecetsavas pufferrel végeztük, 0,15-1 M NaCl gradiens segítségével.

Az 1 ml térfogatú frakciókat a hialuronidáz aktivitás meghatározására szolgáló rendszerrel vizsgáltuk, összeöntöttük és éjszakán át dializáltuk nátrium-azidot és 17 mg/ml trehalózt tartalmazó 20 mM foszfát pufferrel (pH 6,0) szemben. Elvégeztük az összeöntött frakciók fehérje és aktivitás meghatározásait. Ezen kromatográfiás lépés tisztítási faktora körülbelül 3 volt.

10. példa

Diol-LiChrospher kromatográfia

Milli-Q vízzel szemben dializált 20 ml aktív mintát vittünk fel a Diol-LiChrospher oszlopra. Az oszlopot ezután 15 ml Milli-Q vízzel hoztuk egyensúlyba és 5 percig mostuk 2 ml vízzel. Az aktív minta elúcióját 15 percen át végeztük 20 mM ecetsavas pufferrel (pH 5,9, 0-5 mM NaCl gradiens elúció) és 35 percen keresztül 20-100 mM ecetsavas puffer

gradienssel (pH 5,5) amely tartalmazott még 5 mM NaCl-t is. A frakciókat hialuronidáz aktivitásra vizsgáltuk. Az aktív frakciókat összeöntöttük és éjszakán át dializáltuk 20 mM foszfát pufferrel (pH 6,0) szemben, a puffer tartalmazott még nátrium-azidot és 17 mg/ml trehalózt. Elvégeztük az egyesített frakciók fehérje és aktivitás meghatározását. A tisztítási faktor ebben a lépésben 3 volt.

11. példa

RP 18e kromatográfia

Ez a tisztítási lépés csak mint az utolsó lépés alkalmazható és arra irányul, hogy a mintát só és más fehérje szennyezőktől (azaz például peptid proteáz inhibitorok) mentesen állítsuk elő. A hialuronidáz aktivitás teljes mértékben elveszett, mert a manilláz nem képes ellenállni az ezen lépésben alkalmazott szerves oldószereknek. Manilláz mintát vittünk fel az RP 18e oszlopra. Az elválasztás során 0,25 ml/perc frakciókat gyűjtöttünk. Az elúciót 0,1% TFA jelenlétében végeztük és 0-99% acetonitril vízben gradienst alkalmaztunk. Az RP-tisztított mintákat közvetlenül felhasználhatjuk aminosav szekvenáláshoz, MALDI méréshez, szénhidrát szerkezet meghatározáshoz és standardként a manilláz további sarzsainak tisztításához.

12. példa

Aktivitás meghatározás - turbiditás csökkenés vizsgálati eljárás

A hialuronidáz aktivitás meghatározást a turbiditás csökkenéses mérésekkel végeztük. Hialuronán kereskedelemben hozzáférhető készítményeit (különböző állati szövetekből és

folyadékokból izolálva, mint például emberi köldökzsínórból és kakastaréjból) és hialuronidázokat (endo- β -glükózaminidázok marha heréből, sertés heréből, méhméregből; liázok *Streptomyces hyalurolyticus*-ból) alkalmaztunk megfelelő aktivitás vizsgálati körülmények létrehozására. A *Hirudo medicinalis*-ból származó endo- β -glükózaminidáz részleges tisztítását saját laborunkban végeztük.

Hialuronán törzsoldatot (koncentrációja 2 mg/ml) készítettünk oly módon, hogy a HA-t 0,3 M foszfát pufferben (pH 5,3) oldottuk fel. Ezt az oldatot ugyanezen pufferrel hígítottuk 0,2 mg/ml koncentrációra közvetlenül a vizsgálatot megelőzően. Az enzimet tartalmazó frakciókat megfelelő enzim tartalomig hígítottuk (0,5-5 WHO egység) 20 mM foszfát pufferrel, amely tartalmazott még 0,01% marha albumint és 77 mM NaCl-t (enzim hígító puffer). Ezen minták 0,1 milliliteréhez 0,1 ml hialuronán oldatot (0,2 mg/ml) adtunk, összekevertük és 45 percig inkubáltuk 37 °C-on. A vizsgálatot két párhuzamosban végeztük. A reakció leállításához az elegyet 1,0 ml albumin reagenssel hígítottuk (0,1% albumint oldottunk fel 80 mM ecetsav és 40 mM nátrium-acetát puffer keverékében, pH 3,75). Szobahőmérsékleten vagy 37 °C-on végzett 10 perc inkubálás után leolvastuk az optikai denzitás értékét 600 nm hullámhossznál és az aktivitást standarddal összehasonlítva (SLT-program) WHO (IU) egységekben fejeztük ki. Marha here eredetű hialuronidáz WHO készítményét használtuk fel [Humphrey: Bull. World Health Org. 16 291 (1957)] standardként.

13. példa

Fehérje becslés

Az oszlop eluátumok fehérje tartalmát az oldatok ultraibolya abszorbaneciájának mérésével határoztuk meg 280 nm hullámhossznál. Az összeöntött frakciók fehérje tartalmát Pierce mikromódszer segítségével határoztuk meg. Referencia fehérjeként a BSA oldatot alkalmaztuk.

14. példa

SDS-PAGE elektroforézis

Az elektroforézist Laemmli eljárása szerint végeztük [Laemmli és mtsai.: Nature 227 680 (1970)]. A következő géleket használtuk: 4-20% gradiens vagy 12,5% elválasztó gél és 4% gyűjtőgél. A mintákkal nátrium-dodecil-szulfát és β -merkaptó-etanol jelenlétében végeztük az elektroforézist. A fehérjéket Coomassie Brilliant Blue és/vagy ezüst festés (a Pharmacia előírásoknak megfelelően) segítségével tettük láthatóvá.

15. példa

Izoelektromos fókuszálás

Annak érdekében, hogy izoelektromos fókuszálást tanulmányozzunk a manilláz készítményen, a gyártó (Pharmacia) által biztosított eljárást vettük át. A fókuszálást követően a gél-t fixáltuk és ezüst festést végeztünk (a Pharmacia eljárás szerint).

16. példa

Immunglobulin előállítás nyulak immunszérumból (anti-ConA, anti-hemoglobin és anti-peptid nyúl antitestek)

A nyúl szérumot a következő immunogének segítségével termeltettük: konkanavalin-A lektin, hemoglobinok keveréke és peptid-KLH konjugátumok. A peptid szekvencia azonos volt a manilláz N-terminális részét alkotó 14 aminosav szekvenciájával (KEIAVTIDDKNVIA).

A szérumot a Protein-A Sepharose (Pharmacia, kat. szám: 17-0780-01) oszlopon tisztítottuk a standard Pharmacia előírásoknak megfelelően. Az IgG minták tisztaságát SDS-PAGE és ELISA vizsgálati eljárás segítségével ellenőriztük.

17. példa

Western immunblott vizsgálati eljárás

A minták megfelelő kisebb részegységeit és ismert molekulatömegű előre megfestett molekula markereket vittünk SDS-PAGE analízisre a fentebb leírtak szerint. Előre megfestett BioRad molekulatömeg markert alkalmaztunk. A fehérjét elektroforetikusan vittük át poliakrilamid gélekről ($0,8 \text{ mA/cm}^2$) Immobilon polivinil-difluorid (PVDF) membránokra transzfer puffer jelenlétében 100 percen keresztül. A PVDF membránt blokkoló oldattal inkubáltuk (PBS, pH 7,5 + 2% zsírmentes tej) 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezt követően a membránt 2 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten az antitesttel, amit megfelelő arányban a blokkoló oldatban hígítottunk ki. A membránt TBS + 0,05% Tween-20 eleggyel (pH 7,5) mostuk és 2 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten a második antitesttel, kecske eredetű

anti-nyúl lúgos foszfatáz konjugátummal (BioRad). A membránt kétszer mostuk TBS + Tween-20 eleggyel és 10 percig inkubáltuk BCIP lúgos foszfatáz szubsztrát oldattal. A leállító puffer hozzáadásával fejeztük be a reakciót.

18. példa

Aminosav szekvenálás

A manilláz 33 N-terminális aminosav szekvenciáját Edman lebontás segítségével kaptuk meg. A manilláz minták SDS-PAGE elválasztása után a sávokat PVDF membránra vittük át, Coomassie Blue alkalmazásával festettük, kivágtuk és szekvenáltuk. Ugyanezt az aminosav szekvenciát kaptuk meg az RP-oszlop kromatográfia segítségével végzett utolsó tisztítási lépés során kapott minta esetében.

19. példa

Az enzim aktivitás pH függése (*Hirudinaria manillensis* és *Hirudo medicinalis* pióca fejrészekből izolált hialuronidáz esetében)

Az ezen kísérletben felhasznált hialuronidáz mintákat vagy *Hirudinaria manillensis* vagy *Hirudo medicinalis* pióca fejrészekből extraháltuk és ammónium-szulfátos precipitációval valamint kationcserés kromatográfiával részlegesen megtisztítottuk. Minden egyes 500 WHO egység/ml mennyiséget tartalmazó mintát 20 °C, +4 °C és 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk 2,6 és 9,0 közötti pH tartományban (20 mM ecetsav pH 2,6 és 5 között; 20 mM foszfát puffer pH 5 és 9 között). Az enzim aktivitást 1, 2 valamint 7 napos inkubációs periódus után mértük le. A pH tartománynak mind a savas és lúgos szélső értékeinél ugyanolyan fokú aktivitás gátlást

figyeltünk meg mindkét hialuronidáz esetében. Azonban a hosszabb inkubációs időtartamok esetében a manilláz stabilabb volt mint a *Hirudo medicinalis* hialuronidáz; azaz például 7 nap inkubálás után pH 7,0 értéknél +4 °C-on és 37 °C-on a manilláz - sorrendben megfeleltetve - kiinduló aktivitásának 75 illetve 60 százalékát tartotta meg. Az ugyanilyen körülmények között inkubált *Hirudo medicinalis* hialuronidáz már egy nap eltelte után inaktív volt.

20. példa

Hialuronidázok stabilitás mérése kutya szérum jelenlétében (*Hirudinaria manillensis* és *Hirudo medicinalis* pióca fejrészekből izolált hialuronidáz esetében)

A manilláz, *Hirudo medicinalis* hialuronidáz és marha here hialuronidáz 5 kU/ml mintáit kutya vagy patkány eredetű, citráttal kezelt plazmával hígítottuk 250 U/ml végső koncentrációig. Utána ezeket az oldatokat -20 °C, +4 °C és 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk 0-7 nap időtartományban. Ugyanezeket a hialuronidázokat tartalmazó, pufferben hígított kontrollokat is bevettünk ebbe a kísérletbe. Végül le-mértük a hialuronidáz aktivitást.

21. példa

Szennyező enzim aktivitások

A pióca eredetű hialuronidáz tisztítási folyamatának minden egyes lépésében ellenőriztük a készítményt más, fehérjét lebontani képes enzimekre univerzális proteáz szubsztrát segítségével (Boehringer Mannheim, kat. szám: 1080 733) Twining módszere szerint [Twining: Anal. Biochem. 143 30 (1984)].

22. példa

Heparin hatása a hialuronidáz aktivitásra

A hialuronán hialuronidázokkal történő hasítása redukáló cukrok felszabadulását eredményezi. A felszabadított cukrok mennyiségét kolorimetriásan mértük Park és Johnson módosított eljárása szerint [Park és Johnson: J. Biol. Chem. 181 149 (1949)]. A heparin manilláz és marha here hialuronidáz aktivitásra gyakorolt hatásának mérésére két aktivitás meghatározást végeztünk, egyet heparin jelenlétében, a másodikat heparin nélkül. 25 µl térfogatú (3,2 WHO egység) hialuronidáz mintákat inkubáltunk 30 percig 37 °C-on 25 µl heparin (Liquemin, Fa. Hoffman LaRoche) oldattal, ami 0-24 egység heparint tartalmazott. Ezt követően 50 µl hialuronánt (2,5 mg/ml) adtunk hozzá és az inkubálást 30 percig folytattuk 37 °C-on. A reakciót melegítéssel állítottuk le, 2 percig tartottuk 100 °C-on. Ezt követően 100 µl karbonát-cianid oldatot és 100 µl kálium-ferricianid oldatot adtunk hozzá az inaktivált emésztett elegyhez. A mintákat forrásban levő vízfürdőn melegítettük 15 percig és után jégfürdőben lehűtöttük. Azután 0,75 µl vasIII-ammónium-szulfát oldatot adtunk a reakcióelegyekhez. 15 perc inkubálás után szobahőmérsékleten a kifejlődött színt 690 nm hullámhossznál mértük le Shimadzu spektrofotométer segítségével. Megfelelő vakokat és enzimet nem tartalmazó kontrollokat is bevettünk az egyes vizsgálatokba. Az analízisnek alávetett minta típusa szerint várható redukáló cukrot (glükuronsav vagy N-acetil-glükózamin, 1-15 µg) alkalmaztuk standardként.

23. példa

A manilláz deglikozilálása

A manilláz mintákat PNGase F enzim (BioLabs kat. szám: 701L) segítségével deglikoziláltuk a gyártó utasításai szerint. A deglikozilálást denaturáló és természetes körülmények között végeztük. Az O-glikanáz, neuraminidáz és neuraminidáz + O-glikanáz kezeléseket a Boehringer Mannheim standard előírásoknak megfelelően végeztük. Az összes mintát SDS-PAGE segítségével és aktivitás meghatározási vizsgálattal jellemeztük.

24. példa

Az *E. coli* expressziós vektor megszerkesztése (11. ábra)

E. coli-ban történő expresszióhoz a pASK75 plazmid egy módosított változatát alkalmaztuk, amely hordozza a tet promóter régiót [Skerra: Gene 151 131 (1994)]. A módosítást mi készítettük el oly módon, hogy egy új linkert klónoztunk az *Xba*I és *Hind*III helyek közé. Az új linker tartalmazza az ompA vezető szekvenciát, egy másik többszörös klónozó helyet és egy 6xHis-jelölőt a strep-jelölő helyett.

Az alábbiakban bemutatjuk a linker szekvenciát, amelyet a pASK75 plazmidba klónoztunk.

```

Xba I
119 CTAGATAAAG AGGGCAAAAA ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG GCACTGGCTG
    TATTGC TCCGTTTTT TACTTTTTCT GTCGATAGCG CTAACGTCAC CGTGACCGAC
        1 MetLysLysT hrAlaIleAlaIleAlaValAlaLeuAlaG
            ClaI EcoRI Sfi KpnI SmaI BamHI
179 GTTTCGCTAC CGTAGGCGAG GC AT CGA TGA ATT CGA GCT CGG TAC CCG GGG
    CAAAGCGATG GCATCGCGTC CG TA GCT ACT TAA GCT CGA GCC ATG GGC CCC
        14 IyPheAlaTh rValAlaGlnAla
            XhoI Sfi PstI Eco47III
230 ATC CCT CGA GGT CGA CCT GCA GGC AGC GCTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCA
    TAG GGA GCT CCA GCT GGA CGT CCG TCG CGATACTCTCCTAGCGTAGTGGTAGTGGT
            Hind III
286 TCACTAATAGA
    AGTGATTATCTTGA
        10 sHis.....
    
```

A manilláz expressziós vektor létrehozásához szükséges volt 5' *Cla*I és 3' *Eco*47III restrikciós helyek bejuttatása PCR módszer segítségével. Ezért tehát az alábbi két primert alkalmaztuk:

5'-ATC GAT AAA GAG ATT GCC GTG AC valamint

3'-GTT GTT TCC GAT GCT AAA GCG CT

A PCR terméket először a PCR II vektor rendszerbe (Invitrogen) klónoztuk és szekvenáltuk.

Egy második lépésben a manilláz gént a módosított pASK75 vektorba klónoztuk az 5' *Cla*I és 3' *Eco*47III restrikciós helyeket felhasználva.

Miután ezt a rekombináns manillázt expresszáltuk és aktivitását bebizonyítottuk, egy második PCR reakcióban a His-jelölőt eltávolítottuk és a manilláz gén start kodonját közvetlenül az ompA vezető szekvenciához fuzionáltuk. Ehhez a PCR reakcióhoz a következő primereket alkalmaztuk:

5'-ACC GTA GCG CAG GCC AAA GAG ATT GCC GTG valamint

3'-CAC GGC AAT CTC TTT GGC CTG CGC TAC GGT

25. példa

A bakulo donor plazmid megszerkesztése (12. ábra)

Manilláz expressziójához a *Baculo* vírus expressziós rendszerben a Bac-To-Bac™ bakulovírus expressziós rendszert használtuk fel a Gibco Life Technologies cégtől. Ahhoz, hogy szekciós rendszert állítsunk elő a mézelő méh melittin vezető szekvenciát fuzionáltuk a manilláz génhez és az 5' *Bam*HI és 3' *Kpn*I restrikciós helyek bejuttatásához egyetlen PCR reakciót hajtottunk végre.

5' primer:

CGG ATC CAT GAA ATT CTT AGT CAA CGT TGC CCT TGT TTT TAT
GGT CGT ATA CAT TTC TTA CAT CTA TGC GAA AGA GAT TGC CGT GAC

3' primer:

AAT GTT GAA GCA TAA GGT ACC

A PCR terméket a PCR II vektorba (Invitrogen) klónoztuk és szekvenáltuk. Ezután a melittin-manilláz fúziót a pFastBac vektorba klónoztuk az 5' *Bam*HI és 3' *Kpn*I restriktációs helyeket felhasználva (12. ábra).

26. példa

Az élesztő expressziós vektor megszerkesztése (13. ábra)

Élesztőben történő expresszióhoz a *Pichia* többszörös kópia expressziós rendszert alkalmaztuk (Invitrogen). A manilláz expressziós vektor megszerkesztéséhez a manilláz gén PCR amplifikálós módszerét használtuk fel oly módon, hogy illeszkedő restriktációs végek (5' *Eco*RI, 3' *Not*I) jöjjenek létre a megfelelő vektorba történő ligáláshoz (pPIC9K). Ezért tehát az alábbi primereket alkalmaztuk:

5'-GTA GAA TTC AAA GAG ATT GCC GTG ACA

3'-GAT GCT AAT GTT GAA GCA TAA TGA GCG GCC GC

A *Pichia* szferoplasztok transzformálását megelőzően az expressziós vektort linearizálni kell *Sal*I restriktációs enzim segítségével.

27. példa

Expresszió *E. coli*-ban

A pRG72 expressziós vektort - amely az *ompA* vezető szekvenciához fuzionált formában tartalmazza a sarastatin

struktúrgént - W3110 kompetens sejtekbe transzformáltuk. A sejteket a log fázis közepéig növesztettük és ezután a promótert 200 µg aTC/I hozzáadásával indukáltuk. Egy órával ezt követően a rekombináns manilláz egyértelműen kimutatható volt.

28. példa

Rekombináns bakulovírusok létrehozása és manilláz expresszió a Bac-To-Bac expressziós rendszerrel

A pTD13 donor plazmidot DH10Bac kompetens sejtekbe transzformáltuk, amelyek tartalmazták a bacmidot egy mini-attTn7 target hellyel és a helper plazmidot. A mini-Tn7 elem a donor plazmidon transzponálódik a mini-attTn7 target helyre a bacmidon a helper plazmid által biztosított transzpozíciós fehérjék jelenlétében. Rekombináns bacmidokat tartalmazó telepeket azonosítottunk a lacZ gén megszakításával. Nagy molekulatömegű mini-prep DNS-t állítottunk elő a rekombináns bacmidot tartalmazó kiválasztott *E. coli* klónokból és ezt követően ezeket rovarsejtek fertőzésére használtuk fel.

A módszer részletes leírása megtalálható a reagens készlet használati utasításában.

29. példa

Expresszió élesztőben

Annak ellenőrzésére, hogy a manilláz gént sikerült beépíteni, a telepeket szkrínelni kellett erre a His⁺ Mut⁺ mutánsokra.

Egyetlen telepet felhasználva 100 ml (i) táptalajt oltottunk be 1 literes palackban. A tenyésztési körülmények a

következők voltak: 28-30 °C, 250 ford/perc, fel egészen OD 2-6 értékig. Az expresszió indukálásához a tenyészetet először lecentrifugáljuk, a felülúszót leöntjük és a sejtüledéket friss táptalajban felfuszpendáljuk az eredeti tenyésztési térfogat 1/5 mennyiségét véve. 100% metanolt adunk hozzá 0,5% végső koncentrációig minden 24 órában az indukció fenntartásához. Maximum 6 nap eltelte után a felülúszót SDS-PAGE és az aktivitási vizsgálati eljárás segítségével analizáljuk.

SZEKVENCIALISTA

<210> 1

<211> 488

<212> PRT

<213> pióca

<400> 1

Lys	Glu	Ile	Ala	Val	Thr	Ile	Asp	Asp	Lys	Asn	Val	Ile	Ala	Ser	Val	1	5	10	15
Ser	Glu	Ser	Phe	His	Gly	Val	Ala	Phe	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Ser	Pro	20	25	30	
Lys	Gly	Leu	Trp	Ser	Phe	Val	Asp	Ile	Thr	Ser	Pro	Lys	Leu	Phe	Lys	35	40	45	
Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	Tyr	Phe	Arg	Val	Gly	Gly	Thr	Phe	50	55	60	
Ala	Asn	Trp	Leu	Phe	Phe	Asp	Leu	Asp	Glu	Asn	Asn	Lys	Trp	Lys	Asp	65	70	75	80
Tyr	Trp	Ala	Phe	Lys	Asp	Lys	Thr	Pro	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Arg	85	90	95	
Arg	Trp	Leu	Phe	Arg	Lys	Gln	Asn	Asn	Leu	Lys	Lys	Glu	Thr	Glu	Asp	100	105	110	
Asp	Leu	Val	Lys	Leu	Thr	Lys	Gly	Ser	Lys	Met	Arg	Leu	Leu	Phe	Asp	115	120	125	
Leu	Asn	Ala	Glu	Val	Arg	Thr	Gly	Tyr	Glu	Ile	Gly	Lys	Lys	Met	Thr	130	135	140	
Ser	Thr	Trp	Asp	Ser	Ser	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Phe	Lys	Tyr	Cys	Val	145	150	155	160
Ser	Lys	Gly	Tyr	Gly	Asp	Asn	Ile	Asp	Trp	Glu	Leu	Gly	Asn	Glu	Pro	165	170	175	
Asp	His	Thr	Ser	Ala	His	Asn	Leu	Thr	Glu	Lys	Gln	Val	Gly	Glu	Asp	180	185	190	
Phe	Lys	Ala	Leu	His	Lys	Val	Leu	Glu	Lys	Tyr	Pro	Thr	Leu	Asn	Lys	195	200	205	

Gly Ser Leu Val Gly Pro Asp Val Gly Trp Met Gly Val Ser Tyr Val
210 215 220

Lys Gly Leu Ala Asp Gly Ala Gly Asp Leu Val Thr Ala Phe Thr Leu
225 230 235 240

His Gln Tyr Tyr Phe Asp Gly Asn Thr Ser Asp Val Ser Thr Tyr Leu
245 250 255

Asp Ala Thr Tyr Phe Lys Lys Leu Gln Gln Leu Phe Asp Lys Val Lys
260 265 270

Asp Val Leu Lys Asn Ser Gln His Lys Asp Lys Pro Leu Trp Leu Gly
275 280 285

Glu Thr Ser Ser Gly Tyr Asn Ser Gly Thr Lys Asp Val Ser Asp Arg
290 295 300

Tyr Val Ser Gly Phe Leu Thr Leu Asp Lys Leu Gly Leu Ser Ala Ala
305 310 315 320

Asn Asn Val Lys Val Val Ile Arg Gln Thr Ile Tyr Asn Gly Tyr Tyr
325 330 335

Gly Leu Leu Asp Lys Asn Thr Leu Glu Pro Asn Pro Asp Tyr Trp Leu
340 345 350

Met His Val His Asn Ser Leu Val Gly Asn Thr Val Phe Lys Val Asp
355 360 365

Val Ser Asp Pro Thr Asn Lys Ala Arg Val Tyr Ala Gln Cys Thr Lys
370 375 380

Thr Asn Ser Lys His Thr Gln Ser Arg Tyr Tyr Lys Gly Ser Leu Thr
385 390 395 400

Ile Phe Ala Leu Asn Val Gly Asp Glu Asp Val Thr Leu Lys Ile Asp
405 410 415

Gln Tyr Gly Gly Lys Lys Ile Tyr Ser Tyr Ile Leu Thr Pro Glu Gly
420 425 430

Gly Gln Leu Thr Ser Gln Lys Val Leu Leu Asn Gly Lys Glu Leu Lys
435 440 445

Leu Val Ser Asp Gln Leu Pro Glu Leu Asn Ala Asn Glu Ser Lys Thr
450 455 460

Ser Phe Thr Leu Ser Pro Lys Thr Phe Gly Phe Phe Val Val Ser Asp
465 470 475 480

Ala Asn Val Glu Ala Cys Lys Lys
485

<210> 2
 <211> 1464
 <212> DNS
 <213> pióca
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) ... (1464)
 <220>
 <221> variáció
 <222> (667) ... (669)
 <223> Xaa = Tyr vagy Asn
 <400> 2

aaa gag att gcc gtg aca att gac gat aag aat gtg att gca tct gcc	48
Lys Glu Ile Ala Val Thr Ile Asp Asp Lys Asn Val Ile Ala Ser Ala	
1 5 10 15	
agt ggg tct ttc ctt gga gtt gcc ttt gat gcg tct cta ttt tcg ccc	96
Ser Gly Ser Phe Leu Gly Val Ala Phe Asp Ala Ser Leu Phe Ser Pro	
20 25 30	
aag ggt ctt tgg agc ttt gtt gat att acc tct cca aaa ttg ttc aaa	144
Lys Gly Leu Trp Ser Phe Val Asp Ile Thr Ser Pro Lys Leu Phe Lys	
35 40 45	
ttg ctg gaa gga ctt tct cct gga tac ttc agg gtt ggc gga acg ttt	192
Leu Leu Glu Gly Leu Ser Pro Gly Tyr Phe Arg Val Gly Gly Thr Phe	
50 55 60	
gcc aat tgg ctg ttt ttt gac ttg gac gaa aat aat aag tgg aag gat	240
Ala Asn Trp Leu Phe Phe Asp Leu Asp Glu Asn Asn Lys Trp Lys Asp	
65 70 75 80	
tat tgg gct ttt aaa gac aaa acc ccc gaa act gcg aca ata aca agg	288
Tyr Trp Ala Phe Lys Asp Lys Thr Pro Glu Thr Ala Thr Ile Thr Arg	
85 90 95	
aga tgg ctg ttc aga aaa caa aat aat ctg aaa aag gag act ttt gac	336
Arg Trp Leu Phe Arg Lys Gln Asn Asn Leu Lys Lys Glu Thr Phe Asp	
100 105 110	
aat tta gtg aaa cta aca aag gga agc aag atg aga ttg tta ttc gat	384
Asn Leu Val Lys Leu Thr Lys Gly Ser Lys Met Arg Leu Leu Phe Asp	
115 120 125	

ttg aat gcc gaa gtg agg act ggt tat gaa att gga aag aag atg aca	432
Leu Asn Ala Glu Val Arg Thr Gly Tyr Glu Ile Gly Lys Lys Met Thr	
130 135 140	
tcc act tgg gat tca tcg gag gct gaa aag tta ttt aaa tat tgt gtg	480
Ser Thr Trp Asp Ser Ser Glu Ala Glu Lys Leu Phe Lys Tyr Cys Val	
145 150 155 160	
tca aaa ggt tac gga gac aat atc gat tgg gaa ctt gga aat gaa ccg	528
Ser Lys Gly Tyr Gly Asp Asn Ile Asp Trp Glu Leu Gly Asn Glu Pro	
165 170 175	
gac cac acc tca gct cac aat tta act gaa aag cag gtt gga gaa gat	576
Asp His Thr Ser Ala His Asn Leu Thr Glu Lys Gln Val Gly Glu Asp	
180 185 190	
ttt aaa gca ctg cat aaa gtt cta gag aaa tat cca act ctt aac aag	624
Phe Lys Ala Leu His Lys Val Leu Glu Lys Tyr Pro Thr Leu Asn Lys	
195 200 205	
gga tcg ctc gtt ggt cca gat gta ggg tgg atg ggc gtc agt wac gtc	672
Gly Ser Leu Val Gly Pro Asp Val Gly Trp Met Gly Val Ser Xaa Val	
210 215 220	
aag gga ttg gca gac gag gcr ggt gac cat gta ack gct ttt aca ctc	720
Lys Gly Leu Ala Asp Glu Xaa Gly Asp His Val Xaa Ala Phe Thr Leu	
225 230 235 240	
cac caa tat tat ttc gat gga aac acy tct gat gta tca ata tat ctt	768
His Gln Tyr Tyr Phe Asp Gly Asn Xaa Ser Asp Val Ser Ile Tyr Leu	
245 250 255	
gat gcc aca tac ttt aag aag ctg caa caa cta ttt gat aaa gtg aaa	816
Asp Ala Thr Tyr Phe Lys Lys Leu Gln Gln Leu Phe Asp Lys Val Lys	
260 265 270	
gat gtt ttg aaa gat tct cca cat aaa gac gaa cca tta tgg ctt gga	864
Asp Val Leu Lys Asp Ser Pro His Lys Asp Glu Pro Leu Trp Leu Gly	
275 280 285	
gaa aca agt tct gga tac aac agc ggc aca gaa gat gta tcc gat cga	912
Glu Thr Ser Ser Gly Tyr Asn Ser Gly Thr Glu Asp Val Ser Asp Arg	
290 295 300	
tat gtt tca gga ttt cta aca tta gac aag ttg ggt ctc agt gca gcc	960
Tyr Val Ser Gly Phe Leu Thr Leu Asp Lys Leu Gly Leu Ser Ala Ala	
305 310 315 320	
aac aat gta aag gtt gtt ata aga cag aca ata tac aat gga tat tat	1008
Asn Asn Val Lys Val Val Ile Arg Gln Thr Ile Tyr Asn Gly Tyr Tyr	
325 330 335	
ggt ctc ctt gac aaa aac act tta gag ccg aat ccg gat tac tgg tta	1056
Gly Leu Leu Asp Lys Asn Thr Leu Glu Pro Asn Pro Asp Tyr Trp Leu	
340 345 350	
atg cat gtt cat aat tct ttg gtc gga aat aca gtt ttt aaa gtt gac	1104
Met His Val His Asn Ser Leu Val Gly Asn Thr Val Phe Lys Val Asp	
355 360 365	

gtt agt gat cca act aat aaa gca aga gtt tac gcg caa tgt acc aaa 1152
Val Ser Asp Pro Thr Asn Lys Ala Arg Val Tyr Ala Gln Cys Thr Lys
370 375 380

aca aat agc aaa cat act caa agc aga tat tac aag ggc tct ttg aca 1200
Thr Asn Ser Lys His Thr Gln Ser Arg Tyr Tyr Lys Gly Ser Leu Thr
385 390 395 400

atc ttt gca ctt aat gtt gga gat gga gat gta acg tta aag atc ggt 1248
Ile Phe Ala Leu Asn Val Gly Asp Gly Asp Val Thr Leu Lys Ile Gly
405 410 415

caa tac agc ggt aaa aaa att tat tca tac att ctg aca cct gaa gga 1296
Gln Tyr Ser Gly Lys Lys Ile Tyr Ser Tyr Ile Leu Thr Pro Glu Gly
420 425 430

gga caa ctt aca tca cag aaa gtt ctc ttg aat gga aag gaa ttg aac 1344
Gly Gln Leu Thr Ser Gln Lys Val Leu Leu Asn Gly Lys Glu Leu Asn
435 440 445

tta gtg tct gat cag tta cca gaa cta aat gca gat gaa tcc aaa aca 1392
Leu Val Ser Asp Gln Leu Pro Glu Leu Asn Ala Asp Glu Ser Lys Thr
450 455 460

tct ttc acc tta tcc cca aag aca ttt ggt ttt ttt gtt gtt tcc gat 1440
Ser Phe Thr Leu Ser Pro Lys Thr Phe Gly Phe Phe Val Val Ser Asp
465 470 475 480

gct aat gtt gaa gca tgy aar aar 1464
Ala Asn Val Glu Ala Cys Lys Lys
485

<210> 3

<211> 488

<212> PRT

<213> pióca

<400> 3

Lys Glu Ile Ala Val Thr Ile Asp Asp Lys Asn Val Ile Ala Ser Ala
1 5 10 15

Ser Gly Ser Phe Leu Gly Val Ala Phe Asp Ala Ser Leu Phe Ser Pro
20 25 30

Lys Gly Leu Trp Ser Phe Val Asp Ile Thr Ser Pro Lys Leu Phe Lys
35 40 45

Leu Leu Glu Gly Leu Ser Pro Gly Tyr Phe Arg Val Gly Gly Thr Phe
50 55 60

Ala Asn Trp Leu Phe Phe Asp Leu Asp Glu Asn Asn Lys Trp Lys Asp
65 70 75 80

Tyr Trp Ala Phe Lys Asp Lys Thr Pro Glu Thr Ala Thr Ile Thr Arg
 85 90 95
 Arg Trp Leu Phe Arg Lys Gln Asn Asn Leu Lys Lys Glu Thr Phe Asp
 100 105 110
 Asn Leu Val Lys Leu Thr Lys Gly Ser Lys Met Arg Leu Leu Phe Asp
 115 120 125
 Leu Asn Ala Glu Val Arg Thr Gly Tyr Glu Ile Gly Lys Lys Met Thr
 130 135 140
 Ser Thr Trp Asp Ser Ser Glu Ala Glu Lys Leu Phe Lys Tyr Cys Val
 145 150 155 160
 Ser Lys Gly Tyr Gly Asp Asn Ile Asp Trp Glu Leu Gly Asn Glu Pro
 165 170 175
 Asp His Thr Ser Ala His Asn Leu Thr Glu Lys Gln Val Gly Glu Asp
 180 185 190
 Phe Lys Ala Leu His Lys Val Leu Glu Lys Tyr Pro Thr Leu Asn Lys
 195 200 205
 Gly Ser Leu Val Gly Pro Asp Val Gly Trp Met Gly Val Ser Xaa Val
 210 215 220
 Lys Gly Leu Ala Asp Glu Xaa Gly Asp His Val Xaa Ala Phe Thr Leu
 225 230 235 240
 His Gln Tyr Tyr Phe Asp Gly Asn Xaa Ser Asp Val Ser Ile Tyr Leu
 245 250 255
 Asp Ala Thr Tyr Phe Lys Lys Leu Gln Gln Leu Phe Asp Lys Val Lys
 260 265 270
 Asp Val Leu Lys Asp Ser Pro His Lys Asp Glu Pro Leu Trp Leu Gly
 275 280 285
 Glu Thr Ser Ser Gly Tyr Asn Ser Gly Thr Glu Asp Val Ser Asp Arg
 290 295 300
 Tyr Val Ser Gly Phe Leu Thr Leu Asp Lys Leu Gly Leu Ser Ala Ala
 305 310 315 320
 Asn Asn Val Lys Val Val Ile Arg Gln Thr Ile Tyr Asn Gly Tyr Tyr
 325 330 335
 Gly Leu Leu Asp Lys Asn Thr Leu Glu Pro Asn Pro Asp Tyr Trp Leu
 340 345 350
 Met His Val His Asn Ser Leu Val Gly Asn Thr Val Phe Lys Val Asp
 355 360 365
 Val Ser Asp Pro Thr Asn Lys Ala Arg Val Tyr Ala Gln Cys Thr Lys
 370 375 380
 Thr Asn Ser Lys His Thr Gln Ser Arg Tyr Tyr Lys Gly Ser Leu Thr
 385 390 395 400

Ile Phe Ala Leu Asn Val Gly Asp Gly Asp Val Thr Leu Lys Ile Gly
405 410 415
Gln Tyr Ser Gly Lys Lys Ile Tyr Ser Tyr Ile Leu Thr Pro Glu Gly
420 425 430
Gly Gln Leu Thr Ser Gln Lys Val Leu Leu Asn Gly Lys Glu Leu Asn
435 440 445
Leu Val Ser Asp Gln Leu Pro Glu Leu Asn Ala Asp Glu Ser Lys Thr
450 455 460
Ser Phe Thr Leu Ser Pro Lys Thr Phe Gly Phe Phe Val Val Ser Asp
465 470 475 480
Ala Asn Val Glu Ala Cys Lys Lys
485

<210> 4

<211> 1464

<212> DNS

<213> pióca

<220>

<221> CDS

<222> (1) ... (1464)

<220>

<221> variáció

<222> (1348) ... (1350)

<223> Xaa = Val vagy Met

<400> 4

aaa gag att gcc gtg aca att gac gat aag aat gtg att gca tct gcc 48
Lys Glu Ile Ala Val Thr Ile Asp Asp Lys Asn Val Ile Ala Ser Ala
1 5 10 15
agt gag tct ttc cat gga gtt gcc ttt gat gcg tct cta ttt tcg ccc 96
Ser Glu Ser Phe His Gly Val Ala Phe Asp Ala Ser Leu Phe Ser Pro
20 25 30
aag ggt ctt tgg agc ttt gtt gat att acc tct cca aaa ttg ttc aaa 144
Lys Gly Leu Trp Ser Phe Val Asp Ile Thr Ser Pro Lys Leu Phe Lys
35 40 45

ttg ctg gaa gga ctt tct cct gga tac ttc agg gtt ggc gga acg ttt Leu Leu Glu Gly Leu Ser Pro Gly Tyr Phe Arg Val Gly Gly Thr Phe 50 55 60	192
gcc aat cgg ctg ttt ttt gac ttg gac gaa aat aat aag tgg aar gat Ala Asn Arg Leu Phe Phe Asp Leu Asp Glu Asn Asn Lys Trp Lys Asp 65 70 75 80	240
tat tgg gct ttt aaa gac aaa acc ccc gaa act gcg aca ata aca agg Tyr Trp Ala Phe Lys Asp Lys Thr Pro Glu Thr Ala Thr Ile Thr Arg 85 90 95	288
aga tgg ctg ttc aga aaa caa aat aat ctg aaa aag gag act ttt gac Arg Trp Leu Phe Arg Lys Gln Asn Asn Leu Lys Lys Glu Thr Phe Asp 100 105 110	336
aat tta gtg aaa cta aca aag gga agc aag atg aga ttg tta ttc gat Asn Leu Val Lys Leu Thr Lys Gly Ser Lys Met Arg Leu Leu Phe Asp 115 120 125	384
ttg aat gcc gaa gtg agg act ggt tat gaa att gga aag aag atg aca Leu Asn Ala Glu Val Arg Thr Gly Tyr Glu Ile Gly Lys Lys Met Thr 130 135 140	432
tcc act tgg gat tca tcg gag gct gaa aag tta ttt aaa tat tgt gtg Ser Thr Trp Asp Ser Ser Glu Ala Glu Lys Leu Phe Lys Tyr Cys Val 145 150 155 160	480
tca aaa ggt tac gga gac aat atc gat tgg gaa ctt ggg aat gga ccg Ser Lys Gly Tyr Gly Asp Asn Ile Asp Trp Glu Leu Gly Asn Gly Pro 165 170 175	528
gac cac acc tca gct cac aat tta act gaa aag cag gtt gga gaa gat Asp His Thr Ser Ala His Asn Leu Thr Glu Lys Gln Val Gly Glu Asp 180 185 190	576
ttt aaa gca ctg cat aaa gtt cta gag aaa tat cca act ctt aac aag Phe Lys Ala Leu His Lys Val Leu Glu Lys Tyr Pro Thr Leu Asn Lys 195 200 205	624
gga tcg ctc gtt ggt cca gat gta ggg tgg atg ggc gtc agt tac gtc Gly Ser Leu Val Gly Pro Asp Val Gly Trp Met Gly Val Ser Tyr Val 210 215 220	672
aag gga ttg gca gac gag gca ggt gac cat gta act gct ttt aca ctc Lys Gly Leu Ala Asp Glu Ala Gly Asp His Val Thr Ala Phe Thr Leu 225 230 235 240	720
cac caa tat tat ttc gat gga aac acc tct gat gta tca ata tat ctt His Gln Tyr Tyr Phe Asp Gly Asn Thr Ser Asp Val Ser Ile Tyr Leu 245 250 255	768
gat gcc aca tac ttt aag aag ctg caa caa cta ttt gat aaa gtg aaa Asp Ala Thr Tyr Phe Lys Lys Leu Gln Gln Leu Phe Asp Lys Val Lys 260 265 270	816
gat gtt ttg aaa gat tct cca cat aaa gac aaa cca tta tgg ctt gga Asp Val Leu Lys Asp Ser Pro His Lys Asp Lys Pro Leu Trp Leu Gly 275 280 285	864

gaa aca agt tct gga tac aac agc ggc aca gaa gat gta tcc gat cga	912
Glu Thr Ser Ser Gly Tyr Asn Ser Gly Thr Glu Asp Val Ser Asp Arg	
290 295 300	
tat gtt tca gga ttt cta aca tta gac aag ttg ggt ctc agt gca gcc	960
Tyr Val Ser Gly Phe Leu Thr Leu Asp Lys Leu Gly Leu Ser Ala Ala	
305 310 315 320	
aac aat gta aag gtt gtt ata aga cag aca ata tac agt gga tat tat	1008
Asn Asn Val Lys Val Val Ile Arg Gln Thr Ile Tyr Ser Gly Tyr Tyr	
325 330 335	
ggt ccc ctt gac aaa aac act tta gag cca aat ccg gat tac tgg tta	1056
Gly Pro Leu Asp Lys Asn Thr Leu Glu Pro Asn Pro Asp Tyr Trp Leu	
340 345 350	
atg cat gtt cat aat tct ttg gtc gga aat aca gtt ttt aaa gtt gac	1104
Met His Val His Asn Ser Leu Val Gly Asn Thr Val Phe Lys Val Asp	
355 360 365	
gtt agt gat cca act aat aaa gca aga gtt tac gcg caa tgt acc aaa	1152
Val Ser Asp Pro Thr Asn Lys Ala Arg Val Tyr Ala Gln Cys Thr Lys	
370 375 380	
aca aat agc aaa cat act caa agc aga tat tac aag ggc tct ttg aca	1200
Thr Asn Ser Lys His Thr Gln Ser Arg Tyr Tyr Lys Gly Ser Leu Thr	
385 390 395 400	
atc ttt gca ctt aat gtt gga gat gaa gat gta acg tta aag atc ggt	1248
Ile Phe Ala Leu Asn Val Gly Asp Glu Asp Val Thr Leu Lys Ile Gly	
405 410 415	
caa tac agc ggt aaa aaa att tat tca tac att ctg aca cct gaa gga	1296
Gln Tyr Ser Gly Lys Lys Ile Tyr Ser Tyr Ile Leu Thr Pro Glu Gly	
420 425 430	
gga caa ctt aca tca cag aaa gtt ctc ttg aat gga aag gaa ttg aac	1344
Gly Gln Leu Thr Ser Gln Lys Val Leu Leu Asn Gly Lys Glu Leu Asn	
435 440 445	
tta rtg tct gat cag tta cca caa cta aat gca gat gaa tcc aaa aca	1392
Leu Xaa Ser Asp Gln Leu Pro Gln Leu Asn Ala Asp Glu Ser Lys Thr	
450 455 460	
tct ttc acc tta tcc cca aag aca ttt ggt ttt ttt gtt gtt tcc gat	1440
Ser Phe Thr Leu Ser Pro Lys Thr Phe Gly Phe Phe Val Val Ser Asp	
465 470 475 480	
gct aat gtt gaa gca tgy aar aar	1464
Ala Asn Val Glu Ala Cys Lys Lys	
485	

<210> 5

<211> 488

<212> PRT

<213> pióca

<400> 5

Lys	Glu	Ile	Ala	Val	Thr	Ile	Asp	Asp	Lys	Asn	Val	Ile	Ala	Ser	Ala	1	5	10	15
Ser	Glu	Ser	Phe	His	Gly	Val	Ala	Phe	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Ser	Pro	20	25	30	
Lys	Gly	Leu	Trp	Ser	Phe	Val	Asp	Ile	Thr	Ser	Pro	Lys	Leu	Phe	Lys	35	40	45	
Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	Tyr	Phe	Arg	Val	Gly	Gly	Thr	Phe	50	55	60	
Ala	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Asp	Leu	Asp	Glu	Asn	Asn	Lys	Trp	Lys	Asp	65	70	75	80
Tyr	Trp	Ala	Phe	Lys	Asp	Lys	Thr	Pro	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Arg	85	90	95	
Arg	Trp	Leu	Phe	Arg	Lys	Gln	Asn	Asn	Leu	Lys	Lys	Glu	Thr	Phe	Asp	100	105	110	
Asn	Leu	Val	Lys	Leu	Thr	Lys	Gly	Ser	Lys	Met	Arg	Leu	Leu	Phe	Asp	115	120	125	
Leu	Asn	Ala	Glu	Val	Arg	Thr	Gly	Tyr	Glu	Ile	Gly	Lys	Lys	Met	Thr	130	135	140	
Ser	Thr	Trp	Asp	Ser	Ser	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Phe	Lys	Tyr	Cys	Val	145	150	155	160
Ser	Lys	Gly	Tyr	Gly	Asp	Asn	Ile	Asp	Trp	Glu	Leu	Gly	Asn	Gly	Pro	165	170	175	
Asp	His	Thr	Ser	Ala	His	Asn	Leu	Thr	Glu	Lys	Gln	Val	Gly	Glu	Asp	180	185	190	
Phe	Lys	Ala	Leu	His	Lys	Val	Leu	Glu	Lys	Tyr	Pro	Thr	Leu	Asn	Lys	195	200	205	
Gly	Ser	Leu	Val	Gly	Pro	Asp	Val	Gly	Trp	Met	Gly	Val	Ser	Tyr	Val	210	215	220	
Lys	Gly	Leu	Ala	Asp	Glu	Ala	Gly	Asp	His	Val	Thr	Ala	Phe	Thr	Leu	225	230	235	240
His	Gln	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Gly	Asn	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ile	Tyr	Leu	245	250	255	
Asp	Ala	Thr	Tyr	Phe	Lys	Lys	Leu	Gln	Gln	Leu	Phe	Asp	Lys	Val	Lys	260	265	270	
Asp	Val	Leu	Lys	Asp	Ser	Pro	His	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu	Trp	Leu	Gly	275	280	285	
Glu	Thr	Ser	Ser	Gly	Tyr	Asn	Ser	Gly	Thr	Glu	Asp	Val	Ser	Asp	Arg	290	295	300	

Tyr Val Ser Gly Phe Leu Thr Leu Asp Lys Leu Gly Leu Ser Ala Ala
 305 310 315 320
 Asn Asn Val Lys Val Val Ile Arg Gln Thr Ile Tyr Ser Gly Tyr Tyr
 325 330 335
 Gly Pro Leu Asp Lys Asn Thr Leu Glu Pro Asn Pro Asp Tyr Trp Leu
 340 345 350
 Met His Val His Asn Ser Leu Val Gly Asn Thr Val Phe Lys Val Asp
 355 360 365
 Val Ser Asp Pro Thr Asn Lys Ala Arg Val Tyr Ala Gln Cys Thr Lys
 370 375 380
 Thr Asn Ser Lys His Thr Gln Ser Arg Tyr Tyr Lys Gly Ser Leu Thr
 385 390 395 400
 Ile Phe Ala Leu Asn Val Gly Asp Glu Asp Val Thr Leu Lys Ile Gly
 405 410 415
 Gln Tyr Ser Gly Lys Lys Ile Tyr Ser Tyr Ile Leu Thr Pro Glu Gly
 420 425 430
 Gly Gln Leu Thr Ser Gln Lys Val Leu Leu Asn Gly Lys Glu Leu Asn
 435 440 445
 Leu Xaa Ser Asp Gln Leu Pro Gln Leu Asn Ala Asp Glu Ser Lys Thr
 450 455 460
 Ser Phe Thr Leu Ser Pro Lys Thr Phe Gly Phe Phe Val Val Ser Asp
 465 470 475 480
 Ala Asn Val Glu Ala Cys Lys Lys
 485

<210> 6

<211> 1464

<212> DNS

<213> pióca

<220>

<221> CDS

<222> (1) ... (1464)

<400> 6

aaa gag att gcc gtg aca att gac gat aag aat gtg att gca tct gtc	48
Lys Glu Ile Ala Val Thr Ile Asp Asp Lys Asn Val Ile Ala Ser Val	
1 5 10 15	
agt gag tct ttc cat gga gtt gcc ttt gat gcg tct cta ttc tcg ccc	96
Ser Glu Ser Phe His Gly Val Ala Phe Asp Ala Ser Leu Phe Ser Pro	
20 25 30	
aag ggt cct tgg agc ttt gtt aat att acc tct cca aaa ttg ttc aaa	144
Lys Gly Pro Trp Ser Phe Val Asn Ile Thr Ser Pro Lys Leu Phe Lys	
35 40 45	
ttg ctg gaa gga ctt tct cct gga tac ttc agg gtt ggc gga acg ttt	192
Leu Leu Glu Gly Leu Ser Pro Gly Tyr Phe Arg Val Gly Gly Thr Phe	
50 55 60	
gcc aat tgg ctg ttt ttt gac ttg gac gaa aat aat aag tgg aag gat	240
Ala Asn Trp Leu Phe Phe Asp Leu Asp Glu Asn Asn Lys Trp Lys Asp	
65 70 75 80	
tat tgg gct ttt aaa gac aaa acc ccc gaa act gcg aca ata aca agg	288
Tyr Trp Ala Phe Lys Asp Lys Thr Pro Glu Thr Ala Thr Ile Thr Arg	
85 90 95	
aga tgg ctg ttc aga aaa caa aat aat ctg aaa aag gag act ttt gac	336
Arg Trp Leu Phe Arg Lys Gln Asn Asn Leu Lys Lys Glu Thr Phe Asp	
100 105 110	
gat tta gtg aaa cta aca aag gga agc aag atg aga ttg tta ttc gat	384
Asp Leu Val Lys Leu Thr Lys Gly Ser Lys Met Arg Leu Leu Phe Asp	
115 120 125	
ttg aat gcc gaa gtg agg act ggt tat gaa att gga aag aag acg aca	432
Leu Asn Ala Glu Val Arg Thr Gly Tyr Glu Ile Gly Lys Lys Thr Thr	
130 135 140	
tcc act tgg gat tca tcg gag gct gaa aag tta ttt aaa tat tgt gtg	480
Ser Thr Trp Asp Ser Ser Glu Ala Glu Lys Leu Phe Lys Tyr Cys Val	
145 150 155 160	
tca aaa ggt tac gga gac aat atc gat tgg gaa ctt gga aat gaa ccg	528
Ser Lys Gly Tyr Gly Asp Asn Ile Asp Trp Glu Leu Gly Asn Glu Pro	
165 170 175	
gac cac acc tca gct cac aat tta act gaa aag cag gtt gga gaa gat	576
Asp His Thr Ser Ala His Asn Leu Thr Glu Lys Gln Val Gly Glu Asp	
180 185 190	
ttc aaa gca ctg cat aaa gtt tta gag aaa tat cca act ctt aac aag	624
Phe Lys Ala Leu His Lys Val Leu Glu Lys Tyr Pro Thr Leu Asn Lys	
195 200 205	
gga tcg ccc gtt ggt cca gat gta ggg tgg atg ggc gtc agc tac gtc	672
Gly Ser Pro Val Gly Pro Asp Val Gly Trp Met Gly Val Ser Tyr Val	
210 215 220	
aag gga ttg gca gac ggg gca ggt gac ctt gta act gct ttt aca cta	720
Lys Gly Leu Ala Asp Gly Ala Gly Asp Leu Val Thr Ala Phe Thr Leu	
225 230 235 240	
cac caa tat tat ttc gat gga aac acc tct gat gta tca aca tat ctt	768
His Gln Tyr Tyr Phe Asp Gly Asn Thr Ser Asp Val Ser Thr Tyr Leu	
245 250 255	

gat gcc tca tac ttt aaa aag ctg caa cag ctg ttt gat aaa gtg aaa	816
Asp Ala Ser Tyr Phe Lys Lys Leu Gln Gln Leu Phe Asp Lys Val Lys	
260 265 270	
gat gtt ttg aaa aat tct cca cat aaa gac aaa cca tta tgg ctt gga	864
Asp Val Leu Lys Asn Ser Pro His Lys Asp Lys Pro Leu Trp Leu Gly	
275 280 285	
gag aca agt tct gga tgc aac agc ggc aca aaa gat gta tcc gat cga	912
Glu Thr Ser Ser Gly Cys Asn Ser Gly Thr Lys Asp Val Ser Asp Arg	
290 295 300	
tat gtt tca gga ttt cta aca tta gac aag ttg ggt ctc agt gca gcc	960
Tyr Val Ser Gly Phe Leu Thr Leu Asp Lys Leu Gly Leu Ser Ala Ala	
305 310 315 320	
aac aat gta aag gtt gtt ata aga cag aca ata tac aat gga tat tat	1008
Asn Asn Val Lys Val Val Ile Arg Gln Thr Ile Tyr Asn Gly Tyr Tyr	
325 330 335	
ggt ctc ctt gat aaa aac act tta gag cca aat cct gat tac tgg tta	1056
Gly Leu Leu Asp Lys Asn Thr Leu Glu Pro Asn Pro Asp Tyr Trp Leu	
340 345 350	
atg cat gtt cac aat tct ttg gtc gga aat aca gtt ttt aaa gtt gac	1104
Met His Val His Asn Ser Leu Val Gly Asn Thr Val Phe Lys Val Asp	
355 360 365	
gtt ggt gat cca act aat aaa acg aga gtc tat gca caa tgt acc aag	1152
Val Gly Asp Pro Thr Asn Lys Thr Arg Val Tyr Ala Gln Cys Thr Lys	
370 375 380	
aca aat agc aaa cac act caa ggc aag tat tac aag ggc tct ttg aca	1200
Thr Asn Ser Lys His Thr Gln Gly Lys Tyr Tyr Lys Gly Ser Leu Thr	
385 390 395 400	
atc ttt gca ctt aat gtt gga gat gaa gaa gta acg tta aag atc gat	1248
Ile Phe Ala Leu Asn Val Gly Asp Glu Glu Val Thr Leu Lys Ile Asp	
405 410 415	
caa tac ggc ggt aaa aaa att tat tca tac att ctg aca cct gaa gga	1296
Gln Tyr Gly Gly Lys Lys Ile Tyr Ser Tyr Ile Leu Thr Pro Glu Gly	
420 425 430	
gga caa ctt aca tca cag aaa gtt ctc ttg aat gga aag gaa ttg aac	1344
Gly Gln Leu Thr Ser Gln Lys Val Leu Leu Asn Gly Lys Glu Leu Asn	
435 440 445	
tta gtg tct gat cag tta cca gaa cta aat gca gat gaa tcc aaa aca	1392
Leu Val Ser Asp Gln Leu Pro Glu Leu Asn Ala Asp Glu Ser Lys Thr	
450 455 460	
tct ttc acc tta tcc cca aag aca ttt ggt ttt ttt gtt gtt tcc gat	1440
Ser Phe Thr Leu Ser Pro Lys Thr Phe Gly Phe Phe Val Val Ser Asp	
465 470 475 480	
gct aat gtt gaa gca tgy aar aar	1464
Ala Asn Val Glu Ala Cys Lys Lys	
485	

<210> 7

<211> 488

<212> PRT

<213> pióca

<400> 7

Lys	Glu	Ile	Ala	Val	Thr	Ile	Asp	Asp	Lys	Asn	Val	Ile	Ala	Ser	Val	
1				5					10					15		
Ser	Glu	Ser	Phe	His	Gly	Val	Ala	Phe	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Ser	Pro	
			20					25					30			
Lys	Gly	Pro	Trp	Ser	Phe	Val	Asn	Ile	Thr	Ser	Pro	Lys	Leu	Phe	Lys	
		35					40					45				
Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	Tyr	Phe	Arg	Val	Gly	Gly	Thr	Phe	
	50					55					60					
Ala	Asn	Trp	Leu	Phe	Phe	Asp	Leu	Asp	Glu	Asn	Asn	Lys	Trp	Lys	Asp	
	65				70					75					80	
Tyr	Trp	Ala	Phe	Lys	Asp	Lys	Thr	Pro	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Arg	
			85					90						95		
Arg	Trp	Leu	Phe	Arg	Lys	Gln	Asn	Asn	Leu	Lys	Lys	Glu	Thr	Phe	Asp	
		100					105						110			
Asp	Leu	Val	Lys	Leu	Thr	Lys	Gly	Ser	Lys	Met	Arg	Leu	Leu	Phe	Asp	
		115					120					125				
Leu	Asn	Ala	Glu	Val	Arg	Thr	Gly	Tyr	Glu	Ile	Gly	Lys	Lys	Thr	Thr	
	130					135					140					
Ser	Thr	Trp	Asp	Ser	Ser	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Phe	Lys	Tyr	Cys	Val	
145				150					155					160		
Ser	Lys	Gly	Tyr	Gly	Asp	Asn	Ile	Asp	Trp	Glu	Leu	Gly	Asn	Glu	Pro	
			165					170					175			
Asp	His	Thr	Ser	Ala	His	Asn	Leu	Thr	Glu	Lys	Gln	Val	Gly	Glu	Asp	
		180					185						190			
Phe	Lys	Ala	Leu	His	Lys	Val	Leu	Glu	Lys	Tyr	Pro	Thr	Leu	Asn	Lys	
		195				200					205					
Gly	Ser	Pro	Val	Gly	Pro	Asp	Val	Gly	Trp	Met	Gly	Val	Ser	Tyr	Val	
	210					215					220					
Lys	Gly	Leu	Ala	Asp	Gly	Ala	Gly	Asp	Leu	Val	Thr	Ala	Phe	Thr	Leu	
225					230				235					240		
His	Gln	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Gly	Asn	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Thr	Tyr	Leu	
				245				250						255		

Asp Ala Ser Tyr Phe Lys Lys Leu Gln Gln Leu Phe Asp Lys Val Lys
 260 265 270
 Asp Val Leu Lys Asn Ser Pro His Lys Asp Lys Pro Leu Trp Leu Gly
 275 280 285
 Glu Thr Ser Ser Gly Cys Asn Ser Gly Thr Lys Asp Val Ser Asp Arg
 290 295 300
 Tyr Val Ser Gly Phe Leu Thr Leu Asp Lys Leu Gly Leu Ser Ala Ala
 305 310 315 320
 Asn Asn Val Lys Val Val Ile Arg Gln Thr Ile Tyr Asn Gly Tyr Tyr
 325 330 335
 Gly Leu Leu Asp Lys Asn Thr Leu Glu Pro Asn Pro Asp Tyr Trp Leu
 340 345 350
 Met His Val His Asn Ser Leu Val Gly Asn Thr Val Phe Lys Val Asp
 355 360 365
 Val Gly Asp Pro Thr Asn Lys Thr Arg Val Tyr Ala Gln Cys Thr Lys
 370 375 380
 Thr Asn Ser Lys His Thr Gln Gly Lys Tyr Tyr Lys Gly Ser Leu Thr
 385 390 395 400
 Ile Phe Ala Leu Asn Val Gly Asp Glu Glu Val Thr Leu Lys Ile Asp
 405 410 415
 Gln Tyr Gly Gly Lys Lys Ile Tyr Ser Tyr Ile Leu Thr Pro Glu Gly
 420 425 430
 Gly Gln Leu Thr Ser Gln Lys Val Leu Leu Asn Gly Lys Glu Leu Asn
 435 440 445
 Leu Val Ser Asp Gln Leu Pro Glu Leu Asn Ala Asp Glu Ser Lys Thr
 450 455 460
 Ser Phe Thr Leu Ser Pro Lys Thr Phe Gly Phe Phe Val Val Ser Asp
 465 470 475 480
 Ala Asn Val Glu Ala Cys Lys Lys
 485

<210> 8

<211> 23

<212> DNS

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223> mesterséges szekvencia leírása: 5' - primer

<400> 8

atcgataaag agattgccgt gac

23

<210> 9

<211> 23

<212> DNS

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223> mesterséges szekvencia leírása: 3' - primer

<400> 9

gttgtttccg atgctaaagc gct

23

<210> 10

<211> 30

<212> DNS

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223> mesterséges szekvencia leírása: 5' - primer

<400> 10

accgtagcgc aggccaaaga gattgccgtg

30

<210> 11

<211> 30

<212> DNS

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223> mesterséges szekvencia leírása: 3' - primer

<400> 11

cacggcaatc tctttggcct gcgctacggt

30

<210> 12

<211> 87

<212> DNS

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223> mesterséges szekvencia leírása: 5' - primer

<400> 12

cggatccatg aaattcttag tcaacgttgc ccttgttttt atggtcgtat

acatttctta catctatgcg aaagagattg ccgtgac

87

<210> 13

<211> 21

<212> DNS

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223> mesterséges szekvencia leírása: 3' - primer

<400> 13

aatgttgaag cataaggtac c

21

<210> 14

<211> 27

<212> DNS

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223> mesterséges szekvencia leírása: 5' - primer

<400> 14

gtagaattca aagagattgc cgtgaca

27

<210> 15

<211> 32

<212> DNS

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223> mesterséges szekvencia leírása: 3' - primer

<400> 15

gatgctaattg ttgaagcata atgagcggcc gc

32

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. *Hirudinaria manillensis* piócafajból izolált tisztított fehérje, amely aktivitásában heparin által nem befolyásolt hialuronidáz biológiai aktivitással rendelkezik és molekulatömege glikozilációtól függő módon 53-60 kDa.

2. Az 1. igénypont szerinti glikozilált fehérje, amelynek molekulatömege 58 ($\pm$ 2) kDa.

3. Az 1. igénypont szerinti nem glikozilált fehérje, amelynek molekulatömege 54 ($\pm$ 2) kDa.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti fehérje, amelynek izoelektromos pontja 7,2-8,0.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti fehérje, amelynek aminosav szekvenciája a 7. ábrán és az 1. azonosítási szám szerinti szekvenciában feltüntetett aminosav szekvencia.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti fehérje, amelynek specifikus enzim aktivitása nagyobb, mint 100 kU/mg fehérje.

7. Eljárás az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti fehérje izolálására és tisztítására, azzal jellemezve, hogy:

(i) a *Hirudinaria manillensis* fajba tartozó piócák fej-részeit savas pufferben homogenizáljuk és lecentrifugáljuk;

(ii) az (i) lépésben kapott felülúszót ammónium szulfát segítségével precipitáljuk;

(iii) kationcserélő kromatográfiát végzünk;

(iv) konkanavalin-A affinitás kromatográfiát végzünk;

(v) hidrofób kölcsönhatás kromatográfiát végzünk;

(vi) affinitás kromatográfiát végzünk hialuronsav fragmentekkel bevont mátrixon;

(vii) gél permeációs kromatográfiát végzünk; és adott esetben

(viii) a tisztított fehérjét enzimesen vagy kémiai úton deglikoziláljuk.

8. Aktivitásában heparinnal nem befolyásolt hialuronidáz biológiai aktivitással rendelkező fehérje, amelynek molekulatömege glikozilációtól függő módon 53-60 kDa és a 7. igénypont szerinti eljárással állítható elő.

9. A 8. igénypont szerinti fehérje, amelynek specifikus enzim aktivitása nagyobb, mint 100 kU/mg fehérje.

10. DNS szekvencia, amely 1. vagy 9. igénypont szerinti fehérjét kódol.

11. DNS szekvencia, amely 8. igénypont szerinti fehérjét kódol és szekvenciája tartalmazza a 8. ábrán (2. azonosítási szám szerinti szekvencia), 9. ábrán (4. azonosítási szám szerinti szekvencia) és 10. ábrán (6. azonosítási szám szerinti szekvencia) feltüntetett nukleotid szekvenciák bármelyikét.

12. Hialuronidáz biológiai aktivitásával rendelkező rekombináns fehérje, amelyet a 11. igénypont szerinti DNS szekvenciák bármelyike kódol.

13. Hialuronidáz biológiai aktivitásával rendelkező rekombináns fehérje, amelynek molekulatömege glikozilációtól függő módon 55-59 kDa és szekvenciája a 8., 9. vagy 10. ábrán (3., 5. vagy 7. azonosítási szám szerinti szekvenciák) feltüntetett aminosav szekvenciák vagy az ezen szekvenciák-

kal legalább 80% homológiát mutató szekvenciák bármelyike.

14. Expressziós vektor, amely 10. vagy 11. igénypont szerinti DNS szekvenciát tartalmaz.

15. A 12. vagy 13. igénypont szerinti fehérje expressziójára alkalmas gazdasejt, amelyet 14. igénypont szerinti vektorral transzformáltunk.

16. Az 1-6., 8., 9., 12. vagy 13. igénypontok bármelyike szerinti fehérje alkalmazása gyógyszerként.

17. Gyógyhatású készítmény, amely 16. igénypont szerinti fehérjét és gyógyszerészetileg elfogadható hígítót, hordozót vagy excipienst tartalmaz.

18. Gyógyhatású készítmény, amely farmakológiailag aktív vegyületet is tartalmaz.

19. A 18. igénypont szerinti gyógyhatású készítmény, amely farmakológiailag aktív vegyületként heparint tartalmaz.

20. Az 1-6., 8., 9., 12. vagy 13. igénypontok bármelyike szerinti fehérje alkalmazása miokardiális, kardiovaszkuláris és trombózisos rendellenességek és tumorok kezelésére alkalmas gyógyszer előállítására.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



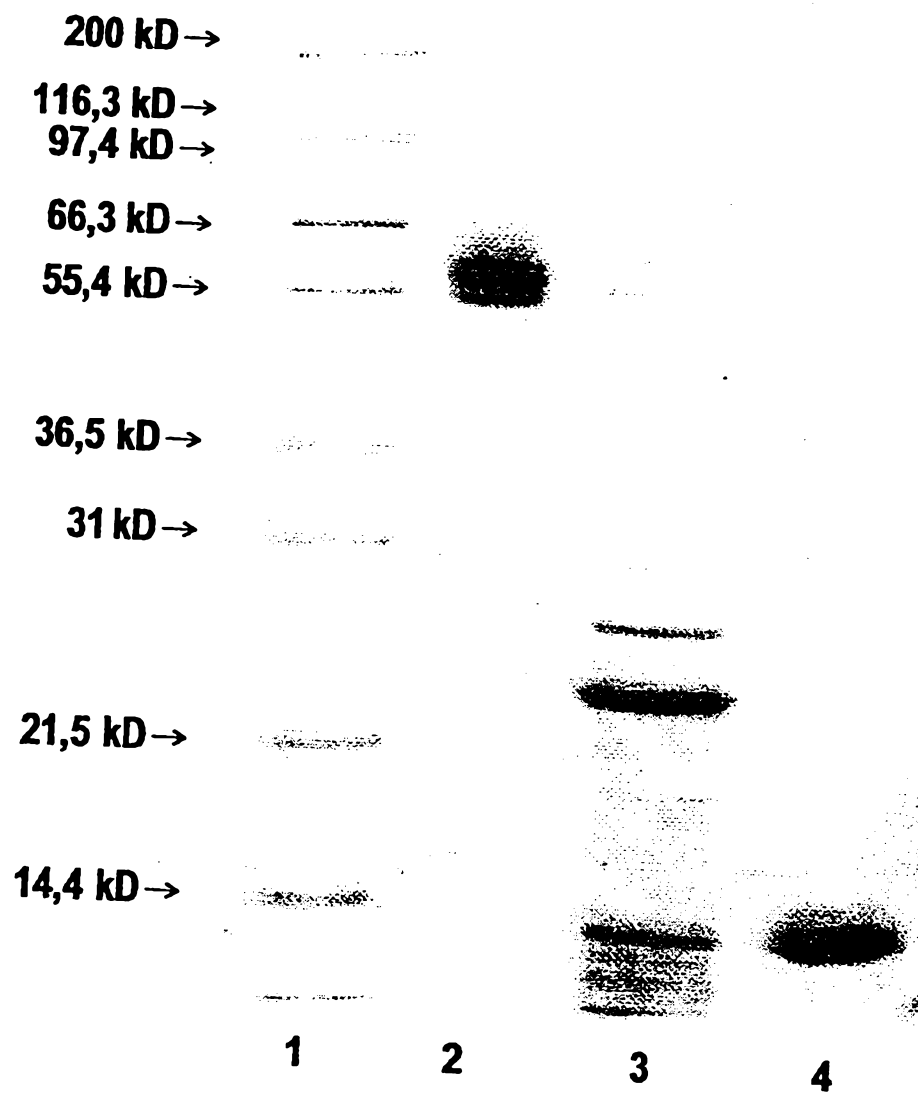
2002.05.16.

69+20=89 oldal


dr. Pethő Árpád

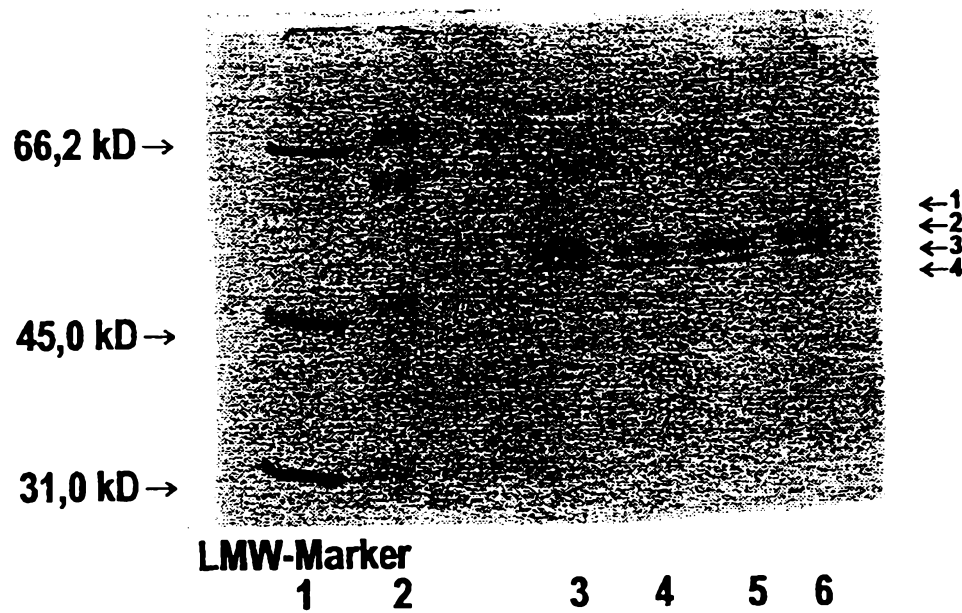
szabadalmi ügyvivő

PCT/ EP00/05181



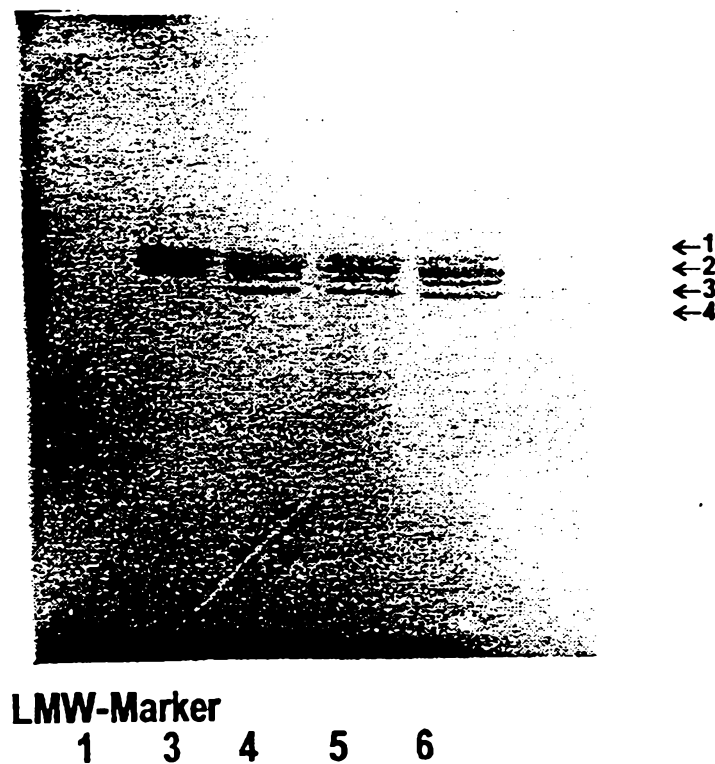
1. ábra

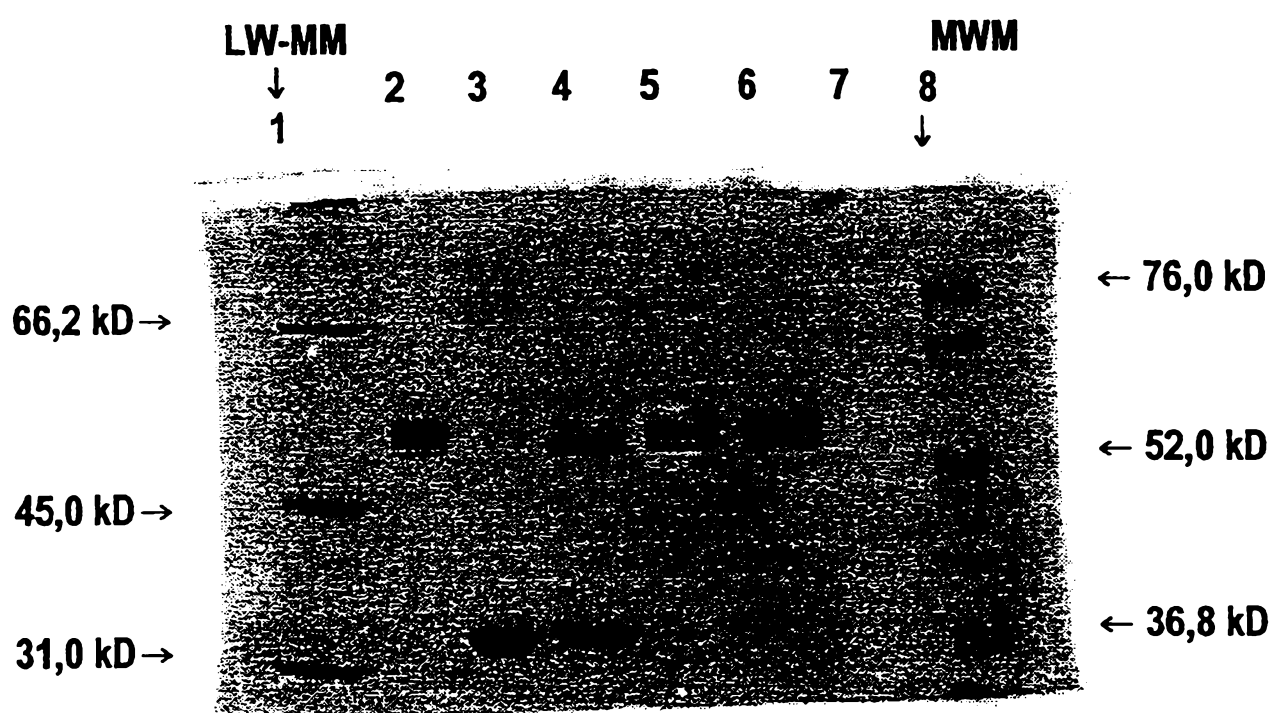
a) - SDS-PAGE



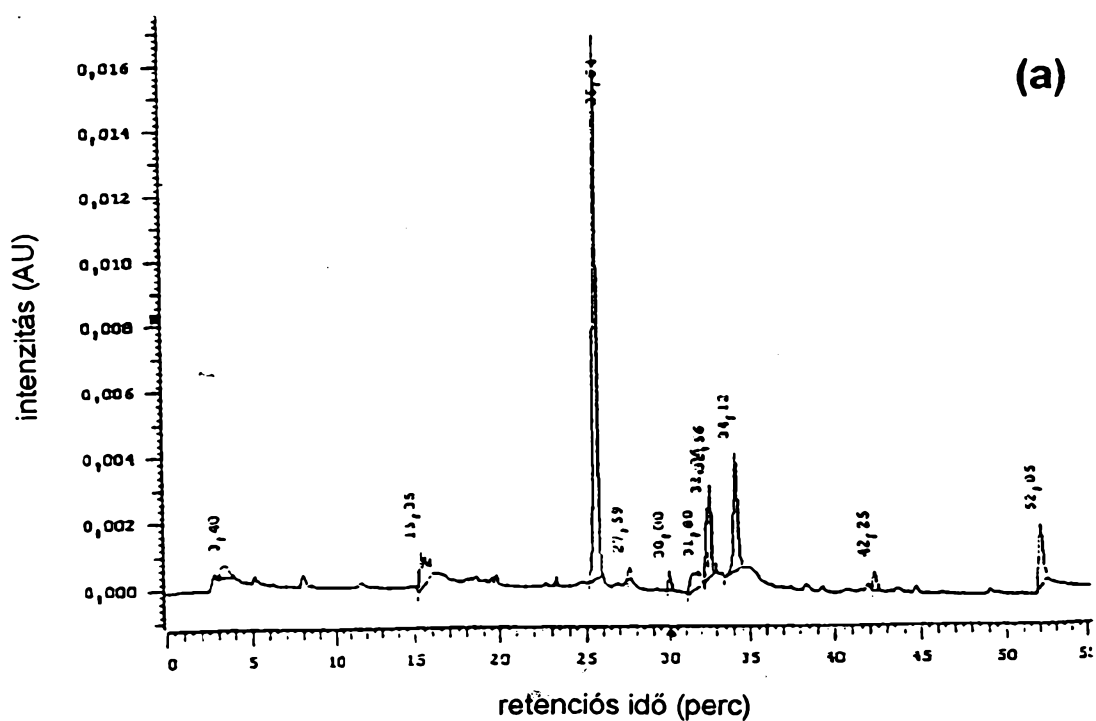
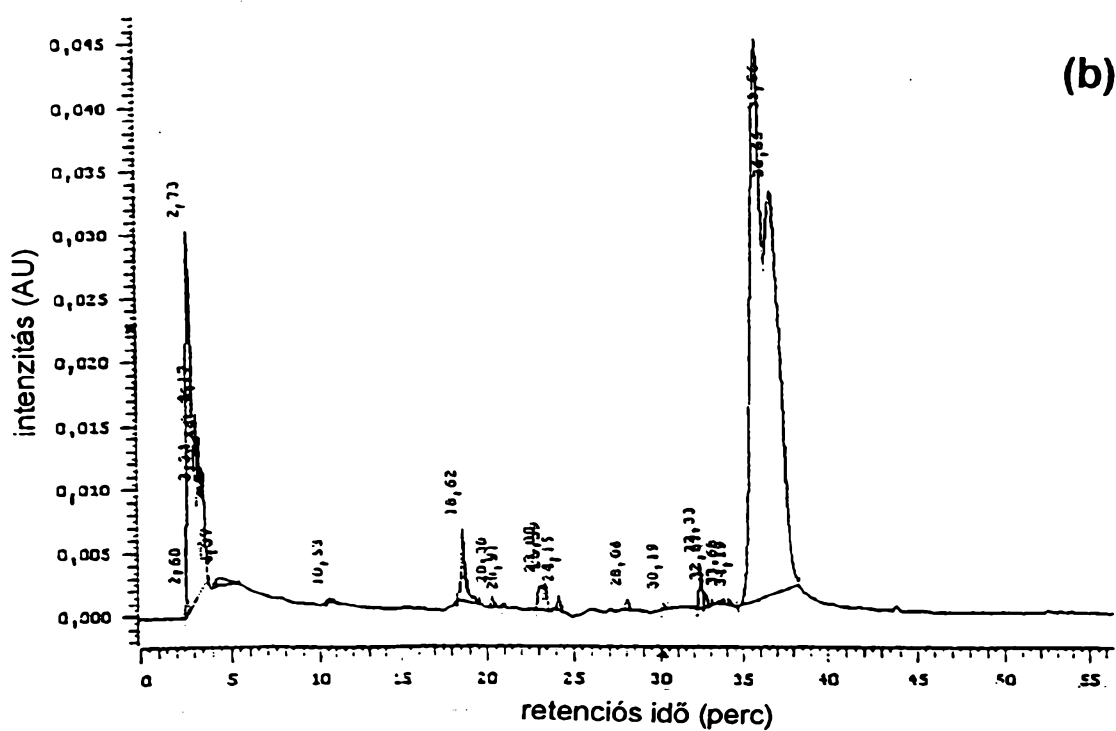
b) - SDS-PAGE-Western blot

2. ábra

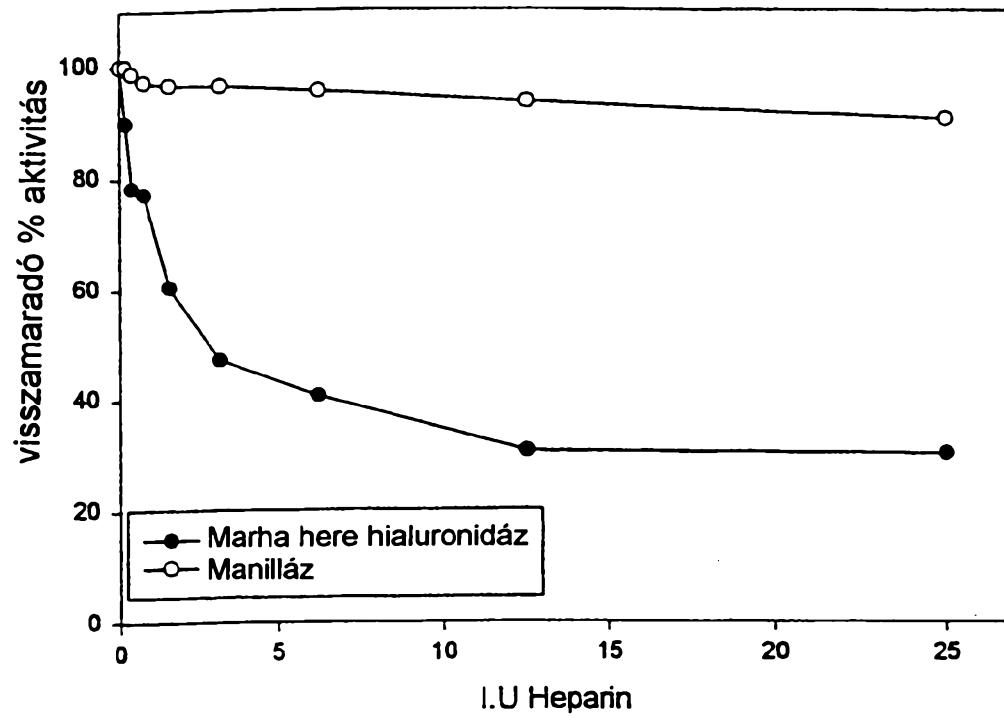




3. ábra

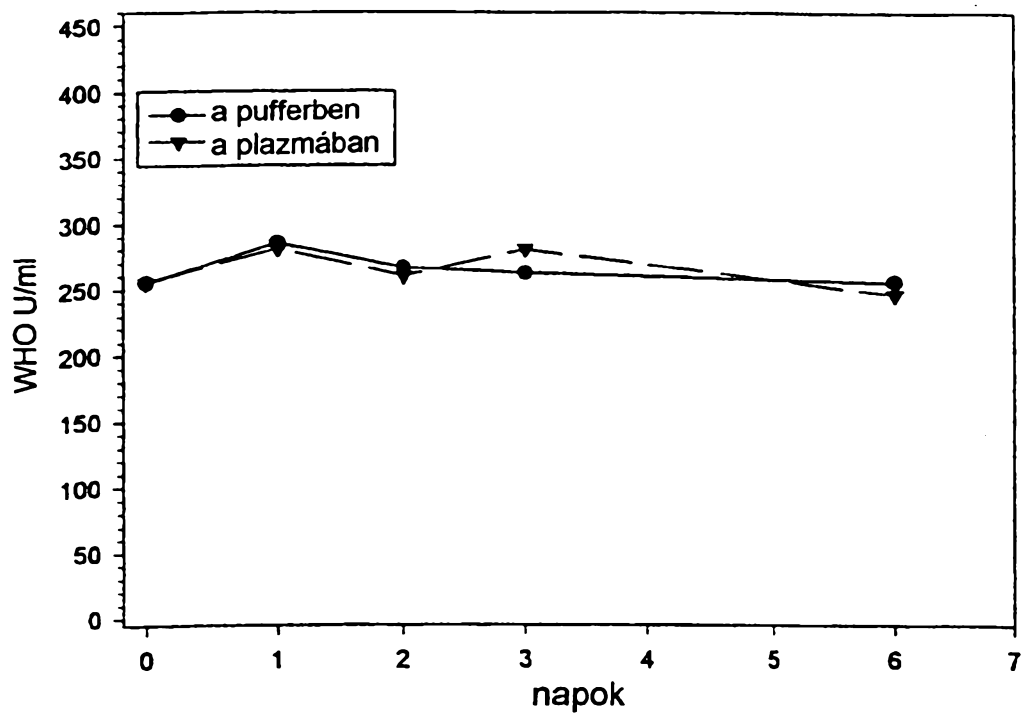


4. ábra



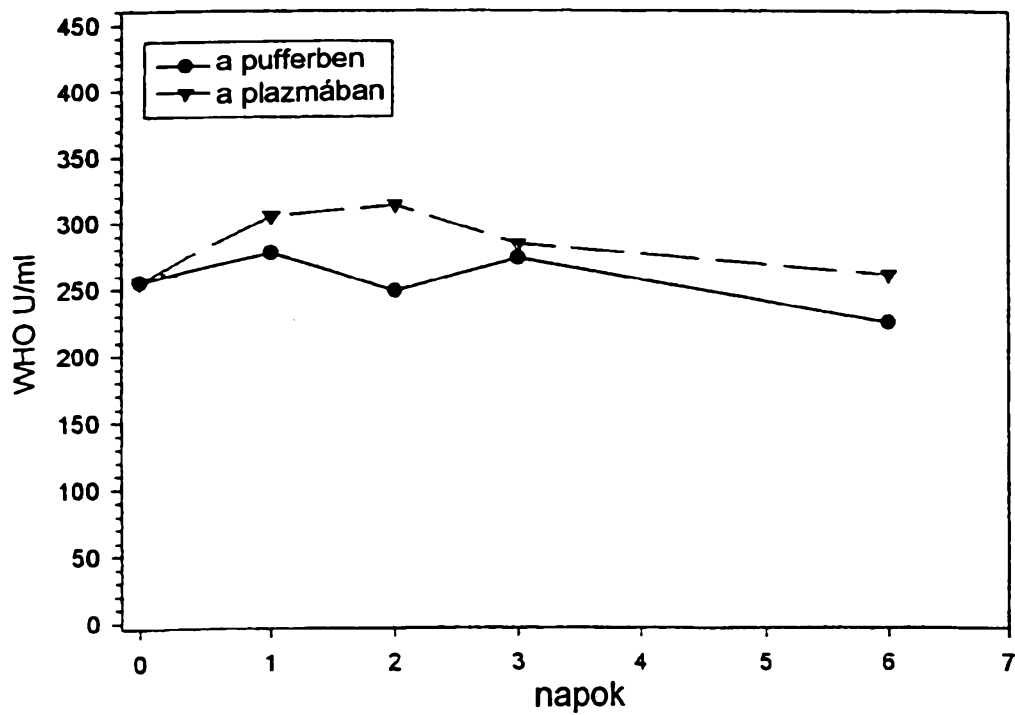
5. ábra

Manilláz aktivitása 4 °C-on



6(a) ábra

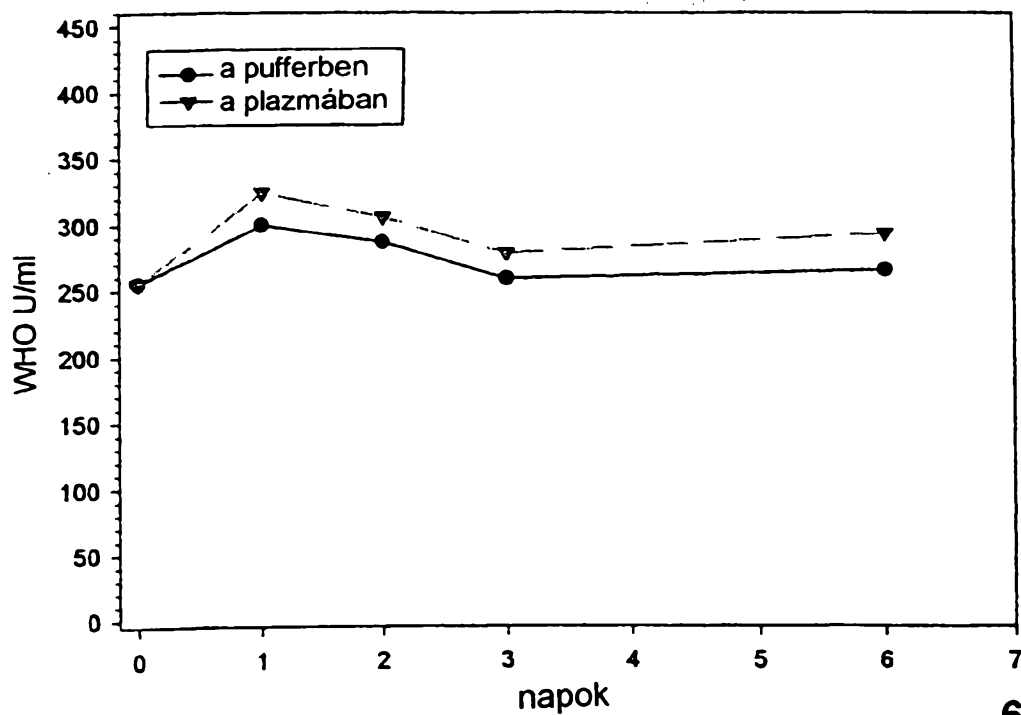
Manilláz aktivitása -20 °C-on



6(b) ábra

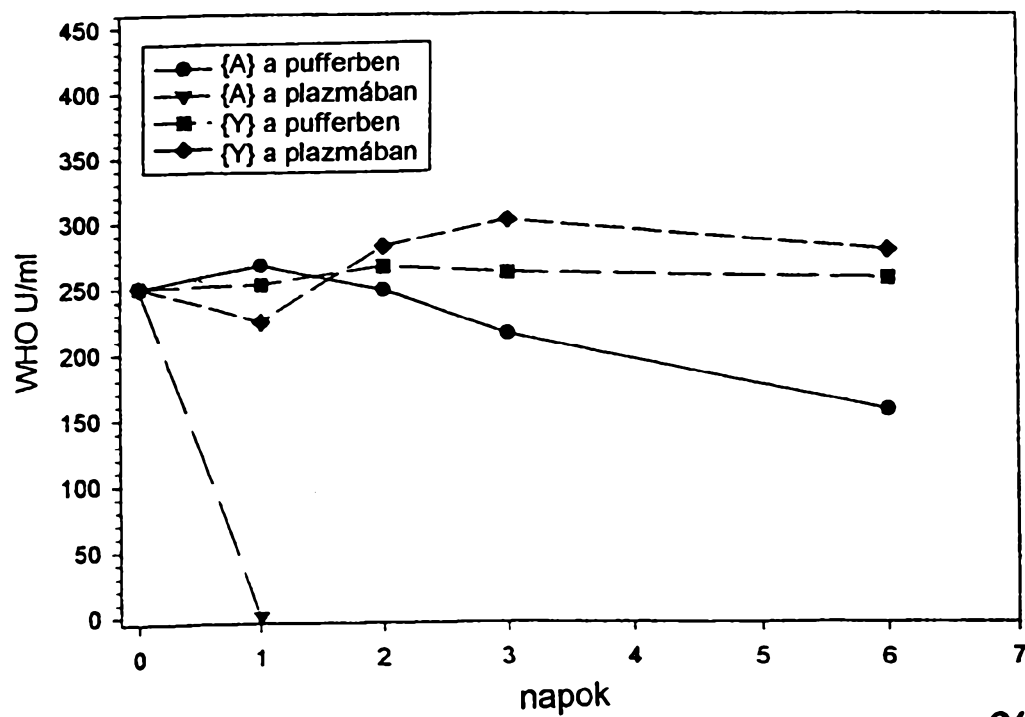
PCT/ EP00/05181

Manilláz aktivitása 37 °C-on



6(c) ábra

H.m. hialuronidáz aktivitása {A} és marha here hialuronidáz aktivitása {Y} 37 °C-on



6(d) ábra

PCT/ EP00/05181

KEIAVTIDDK	NVIASVSESF	HGVAFDASLF	SPKGLWSFVD	ITSPKLFKLL	50
EGLSPGYFRV	GGTFANWLFF	DLDENNKWKD	YWAFKDKTPE	TATITRRWLF	100
RKQNNLKKET	EDDLVKLTKG	SKMRLLEDLN	AEVRTGYEIG	KKMTSTWDSS	150
EAEKLFKYCV	SKGYGDNIDW	ELGNEPDHTS	AHNLTEKQVG	EDFKALHKVL	200
EKYPTLNKGS	LVGPDVGWMG	VSIVKGLADG	AGDLVTAFTL	HQYYFDGNTS	250
DVSTYLDATY	FKKLQQLFDK	VKDVLKNSQH	KDKPLWLGET	SSGYNSGTKD	300
VSDRYVSGFL	TLDKLGLSAA	NNVKVVIRQT	IYNGYYGLLD	KNTLEPNPDY	350
WLMHVVHNSLV	GNTVFKVDVS	DPTNKARVYA	QCTKTNSKHT	QSRYYKGSLT	400
IFALNVGDED	VTLKIDQYGG	KKIYSYILTP	EGGQLTSQKV	LLNGKELKLV	450
SDQLPELNAN	ESKTSFTLSP	KTFGFFVUSD	ANVEACKK		488

7. ábra

AAA	GAG	ATT	GCC	GTG	ACA	ATT	GAC	GAT	AAG	AAT	GTG
K	E	I	A	V	T	I	D	D	K	N	V
ATT	GCA	TCT	GCC	AGT	GGG	TCT	TTC	CTT	GGA	GTT	GCC
I	A	S	A	S	G	S	F	L	G	V	A
TTT	GAT	GCG	TCT	CTA	TTT	TCG	CCC	AAG	GGT	CTT	TGG
F	D	A	S	L	F	S	P	K	G	L	W
AGC	TTT	GTT	GAT	ATT	ACC	TCT	CCA	AAA	TTG	TTC	AAA
S	F	V	D	I	T	S	P	K	L	F	K
TTG	CTG	GAA	GGA	CTT	TCT	CCT	GGA	TAC	TTC	AGG	GTT
L	L	E	G	L	S	P	G	Y	F	R	V
GGC	GGA	ACG	TTT	GCC	AAT	TGG	CTG	TTT	TTT	GAC	TTG
G	G	T	F	A	N	W	L	F	F	D	L
GAC	GAA	AAT	AAT	AAG	TGG	AAG	GAT	TAT	TGG	GCT	TTT
D	E	N	N	K	W	K	D	Y	W	A	F
AAA	GAC	AAA	ACC	CCC	GAA	ACT	GCG	ACA	ATA	ACA	AGG
K	D	K	T	P	E	T	A	T	I	T	R
AGA	TGG	CTG	TTC	AGA	AAA	CAA	AAT	AAT	CTG	AAA	AAG
R	W	L	F	R	K	Q	N	N	L	K	K
GAG	ACT	TTT	GAC	AAT	TTA	GTG	AAA	CTA	ACA	AAG	GGA
E	T	F	D	N	L	V	K	L	T	K	G
AGC	AAG	ATG	AGA	TTG	TTA	TTC	GAT	TTG	AAT	GCC	GAA
S	K	M	R	L	L	F	D	L	N	A	E
GTG	AGG	ACT	GGT	TAT	GAA	ATT	GGA	AAG	AAG	ATG	ACA
V	R	T	G	Y	E	I	G	K	K	M	T
TCC	ACT	TGG	GAT	TCA	TCG	GAG	GCT	GAA	AAG	TTA	TTT
S	T	W	D	S	S	E	A	E	K	L	F
AAA	TAT	TGT	GTG	TCA	AAA	GGT	TAC	GGA	GAC	AAT	ATC
K	Y	C	V	S	K	G	Y	G	D	N	I
GAT	TGG	GAA	CTT	GGA	AAT	GAA	CCG	GAC	CAC	ACC	TCA
D	W	E	L	G	N	E	P	D	H	T	S
GCT	CAC	AAT	TTA	ACT	GAA	AAG	CAG	GTT	GGA	GAA	GAT
A	H	N	L	T	E	K	Q	V	G	E	D
TTT	AAA	GCA	CTG	CAT	AAA	GTT	CTA	GAG	AAA	TAT	CCA
F	K	A	L	H	K	V	L	E	K	Y	P

ACT	CTT	AAC	AAG	GGA	TCG	CTC	GTT	GGT	CCA	GAT	GTA
T	L	N	K	G	S	L	V	G	P	D	V
GGG	TGG	ATG	GGC	GTC	AGT	WAC	GTC	AAG	GGA	TTG	GCA
G	W	M	G	V	S	Y	V	K	G	L	A
GAC	GAG	GCR	GGT	GAC	CAT	GTA	ACK	GCT	TTT	ACA	CTC
D	E	A	G	D	H	V	T	A	F	T	L
CAC	CAA	TAT	TAT	TTC	GAT	GGA	AAC	ACY	TCT	GAT	GTA
H	Q	Y	Y	F	D	G	N	T	S	D	V
TCA	ATA	TAT	CTT	GAT	GCC	ACA	TAC	TTT	AAG	AAG	CTG
S	I	Y	L	D	A	T	Y	F	K	K	L
CAA	CAA	CTA	TTT	GAT	AAA	GTG	AAA	GAT	GTT	TTG	AAA
Q	Q	L	F	D	K	V	K	D	V	L	K
GAT	TCT	CCA	CAT	AAA	GAC	GAA	CCA	TTA	TGG	CTT	GGA
D	S	P	H	K	D	E	P	L	W	L	G
GAA	ACA	AGT	TCT	GGA	TAC	AAC	AGC	GGC	ACA	GAA	GAT
E	T	S	S	G	Y	N	S	G	T	E	D
GTA	TCC	GAT	CGA	TAT	GTT	TCA	GGA	TTT	CTA	ACA	TTA
V	S	D	R	Y	V	S	G	F	L	T	L
GAC	AAG	TTG	GGT	CTC	AGT	GCA	GCC	AAC	AAT	GTA	AAG
D	K	L	G	L	S	A	A	N	N	V	K
GTT	GTT	ATA	AGA	CAG	ACA	ATA	TAC	AAT	GGA	TAT	TAT
V	V	I	R	Q	T	I	Y	N	G	Y	Y
GGT	CTC	CTT	GAC	AAA	AAC	ACT	TTA	GAG	CCG	AAT	CCG
G	L	L	D	K	N	T	L	E	P	N	P
GAT	TAC	TGG	TTA	ATG	CAT	GTT	CAT	AAT	TCT	TTG	GTC
D	Y	W	L	M	H	V	H	N	S	L	V
GGA	AAT	ACA	GTT	TTT	AAA	GTT	GAC	GTT	AGT	GAT	CCA
G	N	T	V	F	K	V	D	V	S	D	P
ACT	AAT	AAA	GCA	AGA	GTT	TAC	GCG	CAA	TGT	ACC	AAA
T	N	K	A	R	V	Y	A	Q	C	T	K
ACA	AAT	AGC	AAA	CAT	ACT	CAA	AGC	AGA	TAT	TAC	AAG
T	N	S	K	H	T	Q	S	R	Y	Y	K
GGC	TCT	TTG	ACA	ATC	TTT	GCA	CTT	AAT	GTT	GGA	GAT
G	S	L	T	I	F	A	L	N	V	G	D

GGA G	GAT D	GTA V	ACG T	TTA L	AAG K	ATC I	GGT G	CAA Q	TAC Y	AGC S	GGT G
AAA K	AAA K	ATT I	TAT Y	TCA S	TAC Y	ATT I	CTG L	ACA T	CCT P	GAA E	GGA G
GGA G	CAA Q	CTT L	ACA T	TCA S	CAG Q	AAA K	GTT V	CTC L	TTG L	AAT N	GGA G
AAG K	GAA E	TTG L	AAC N	TTA L	GTG V	TCT S	GAT D	CAG Q	TTA L	CCA P	GAA E
CTA L	AAT N	GCA A	GAT D	GAA E	TCC S	AAA K	ACA T	TCT S	TTC F	ACC T	TTA L
TCC S	CCA P	AAG K	ACA T	TTT F	GGT G	TTT F	TTT F	GTT V	GTT V	TCC S	GAT D
GCT A	AAT N	GTT V	GAA E	GCA A	TGY C	AAR K	AAR K				

8. ábra folytatása

PCT/EP00/05181

12/20

AAA K	GAG E	ATT I	GCC A	GTG V	ACA T	ATT I	GAC D	GAT D	AAG K	AAT N	GTG V
ATT I	GCA A	TCT S	GCC A	AGT S	GAG E	TCT S	TTC F	CAT H	GGA G	GTT V	GCC A
TTT F	GAT D	GCG A	TCT S	CTA L	TTT F	TCG S	CCC P	AAG K	GGT G	CTT L	TGG W
AGC S	TTT F	GTT V	GAT D	ATT I	ACC T	TCT S	CCA P	AAA K	TTG L	TTC F	AAA K
TTG L	CTG L	GAA E	GGA G	CTT L	TCT S	CCT P	GGA G	TAC Y	TTC F	AGG R	GTT V
GGC G	GGA G	ACG T	TTT F	GCC A	AAT N	CGG R	CTG L	TTT F	TTT F	GAC D	TTG L
GAC D	GAA E	AAT N	AAT N	AAG K	TGG W	AAR K	GAT D	TAT Y	TGG W	GCT A	TTT F
AAA K	GAC D	AAA K	ACC T	CCC P	GAA E	ACT T	GCG A	ACA T	ATA I	ACA T	AGG R
AGA R	TGG W	CTG L	TTC F	AGA R	AAA K	CAA Q	AAT N	AAT N	CTG L	AAA K	AAG K
GAG E	ACT T	TTT F	GAC D	AAT N	TTA L	GTG V	AAA K	CTA L	ACA T	AAG K	GGA G
AGC S	AAG K	ATG M	AGA R	TTG L	TTA L	TTC F	GAT D	TTG L	AAT N	GCC A	GAA E
GTG V	AGG R	ACT T	GGT G	TAT Y	GAA E	ATT I	GGA G	AAG K	AAG K	ATG M	ACA T
TCC S	ACT T	TGG W	GAT D	TCA S	TCG S	GAG E	GCT A	GAA E	AAG K	TTA L	TTT F
AAA K	TAT Y	TGT C	GTG V	TCA S	AAA K	GGT G	TAC Y	GGA G	GAC D	AAT N	ATC I
GAT D	TGG W	GAA E	CTT L	GGG G	AAT N	GGA G	CCG P	GAC D	CAC H	ACC T	TCA S
GCT A	CAC H	AAT N	TTA L	ACT T	GAA E	AAG K	CAG Q	GTT V	GGA G	GAA E	GAT D
TTT F	AAA K	GCA A	CTG L	CAT H	AAA K	GTT V	CTA L	GAG E	AAA K	TAT Y	CCA P
ACT T	CTT L	AAC N	AAG K	GGA G	TCG S	CTC L	GTT V	GGT G	CCA P	GAT D	GTA V

GGG G	TGG W	ATG M	GGC G	GTC V	AGT S	TAC Y	GTC V	AAG K	GGA G	TTG L	GCA A
GAC D	GAG E	GCA A	GGT G	GAC D	CAT H	GTA V	ACT T	GCT A	TTT F	ACA T	CTC L
CAC H	CAA Q	TAT Y	TAT Y	TTC F	GAT D	GGA G	AAC N	ACC T	TCT S	GAT D	GTA V
TCA S	ATA I	TAT Y	CTT L	GAT D	GCC A	ACA T	TAC Y	TTT F	AAG K	AAG K	CTG L
CAA Q	CAA Q	CTA L	TTT F	GAT D	AAA K	GTG V	AAA K	GAT D	GTT V	TTG L	AAA K
GAT D	TCT S	CCA P	CAT H	AAA K	GAC D	AAA K	CCA P	TTA L	TGG W	CTT L	GGA G
GAA E	ACA T	AGT S	TCT S	GGA G	TAC Y	AAC N	AGC S	GGC G	ACA T	GAA E	GAT D
GTA V	TCC S	GAT D	CGA R	TAT Y	GTT V	TCA S	GGA G	TTT F	CTA L	ACA T	TTA L
GAC D	AAG K	TTG L	GGT G	CTC L	AGT S	GCA A	GCC A	AAC N	AAT N	GTA V	AAG K
GTT V	GTT V	ATA I	AGA R	CAG Q	ACA T	ATA I	TAC Y	AGT S	GGA G	TAT Y	TAT Y
GGT G	CCC P	CTT L	GAC D	AAA K	AAC N	ACT T	TTA L	GAG E	CCA P	AAT N	CCG P
GAT D	TAC Y	TGG W	TTA L	ATG M	CAT H	GTT V	CAT H	AAT N	TCT S	TTG L	GTC V
GGA G	AAT N	ACA T	GTT V	TTT F	AAA K	GTT V	GAC D	GTT V	AGT S	GAT D	CCA P
ACT T	AAT N	AAA K	GCA A	AGA R	GTT V	TAC Y	GCG A	CAA Q	TGT C	ACC T	AAA K
ACA T	AAT N	AGC S	AAA K	CAT H	ACT T	CAA Q	AGC S	AGA R	TAT Y	TAC Y	AAG K
GGC G	TCT S	TTG L	ACA T	ATC I	TTT F	GCA A	CTT L	AAT N	GTT V	GGA G	GAT D
GAA E	GAT D	GTA V	ACG T	TTA L	AAG K	ATC I	GGT G	CAA Q	TAC Y	AGC S	GGT G

9. ábra folytatása

PCT/EP00/05181

AAA K	AAA K	ATT I	TAT Y	TCA S	TAC Y	ATT I	CTG L	ACA T	CCT P	GAA E	GGA G
GGA G	CAA Q	CTT L	ACA T	TCA S	CAG Q	AAA K	GTT V	CTC L	TTG L	AAT N	GGA G
AAG K	GAA E	TTG L	AAC N	TTA L	RTG V	TCT S	GAT D	CAG Q	TTA L	CCA P	CAA Q
CTA L	AAT N	GCA A	YAT D	GAA E	TCC S	AAA K	ACA T	TCT S	TTC F	ACC T	TTA L
TCC S	CCA P	AAG K	ACA T	TTT F	GGT G	TTT F	TTT F	GTT V	GTT V	TCC S	GAT D
GCT A	AAT N	GTT V	GAA E	GCA A	TGY C	AAR K	AAR K				

9. ábra folytatása

AAA K	GAG E	ATT I	GCC A	GTG V	ACA T	ATT I	GAC D	GAT D	AAG K	AAT N	GTG V
ATT I	GCA A	TCT S	GTC V	AGT S	GAG E	TCT S	TTC F	CAT H	GGA G	GTT V	GCC A
TTT F	GAT D	GCG A	TCT S	CTA L	TTC F	TCG S	CCC P	AAG K	GGT G	CCT P	TGG W
AGC S	TTT F	GTT V	AAT N	ATT I	ACC T	TCT S	CCA P	AAA K	TTG L	TTC F	AAA K
TTG L	CTG L	GAA E	GGA G	CTT L	TCT S	CCT P	GGA G	TAC Y	TTC F	AGG R	GTT V
GGC G	GGA G	ACG T	TTT F	GCC A	AAT N	TGG W	CTG L	TTT F	TTT F	GAC D	TTG L
GAC D	GAA E	AAT N	AAT N	AAG K	TGG W	AAG K	GAT D	TAT Y	TGG W	GCT A	TTT F
AAA K	GAC D	AAA K	ACC T	CCC P	GAA E	ACT T	GCG A	ACA T	ATA I	ACA T	AGG R
AGA R	TGG W	CTG L	TTC F	AGA R	AAA K	CAA Q	AAT N	AAT N	CTG L	AAA K	AAG K
GAG E	ACT T	TTT F	GAC D	GAT D	TTA L	GTG V	AAA K	CTA L	ACA T	AAG K	GGA G
AGC S	AAG K	ATG M	AGA R	TTG L	TTA L	TTC F	GAT D	TTG L	AAT N	GCC A	GAA E
GTG V	AGG R	ACT T	GGT G	TAT Y	GAA E	ATT I	GGA G	AAG K	AAG K	ACG T	ACA T
TCC S	ACT T	TGG W	GAT D	TCA S	TCG S	GAG E	GCT A	GAA E	AAG K	TTA L	TTT F
AAA K	TAT Y	TGT C	GTG V	TCA S	AAA K	GGT G	TAC Y	GGA G	GAC D	AAT N	ATC I
GAT D	TGG W	GAA E	CTT L	GGA G	AAT N	GAA E	CCG P	GAC D	CAC H	ACC T	TCA S
GCT A	CAC H	AAT N	TTA L	ACT T	GAA E	AAG K	CAG Q	GTT V	GGA G	GAA E	GAT D
TTC F	AAA K	GCA A	CTG L	CAT H	AAA K	GTT V	TTA L	GAG E	AAA K	TAT Y	CCA P

PCT/EP00/05181

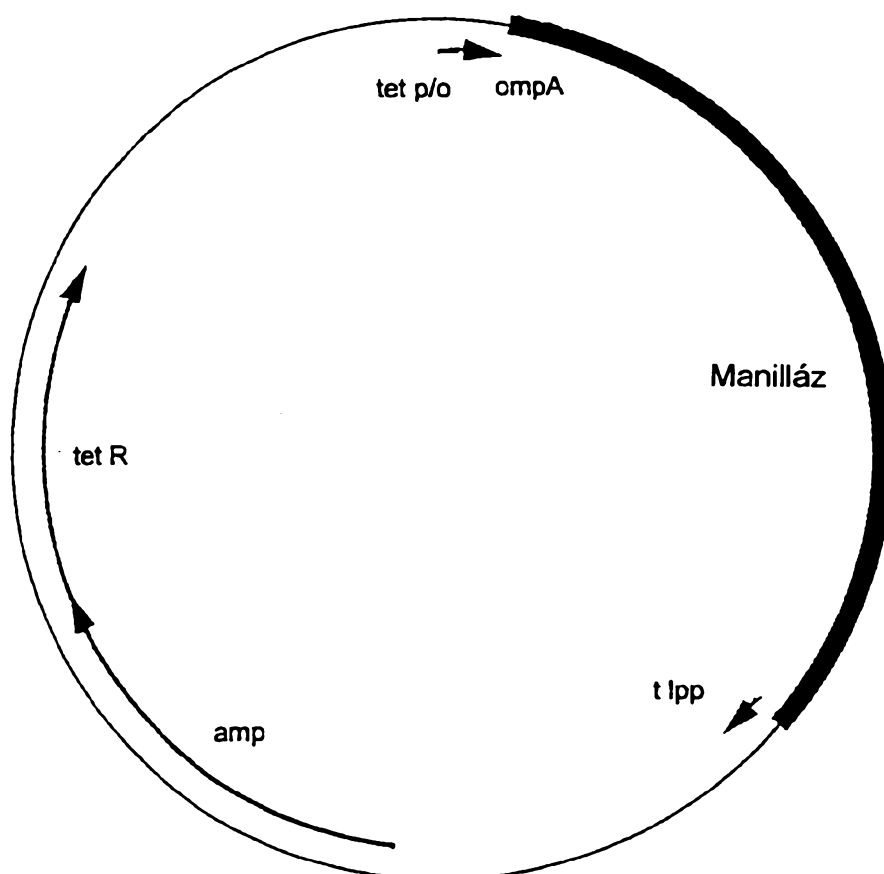
16/20

ACT	CTT	AAC	AAG	GGA	TCG	CCC	GTT	GGT	CCA	GAT	GTA
T	L	N	K	G	S	P	V	G	P	D	V
GGG	TGG	ATG	GGC	GTC	AGC	TAC	GTC	AAG	GGA	TTG	GCA
G	W	M	G	V	S	Y	V	K	G	L	A
GAC	GGG	GCA	GGT	GAC	CTT	GTA	ACT	GCT	TTT	ACA	CTA
D	G	A	G	D	L	V	T	A	F	T	L
CAC	CAA	TAT	TAT	TTC	GAT	GGA	AAC	ACC	TCT	GAT	GTA
H	Q	Y	Y	F	D	G	N	T	S	D	V
TCA	ACA	TAT	CTT	GAT	GCC	TCA	TAC	TTT	AAA	AAG	CTG
S	T	Y	L	D	A	S	Y	F	K	K	L
CAA	CAG	CTG	TTT	GAT	AAA	GTG	AAA	GAT	GTT	TTG	AAA
Q	Q	L	F	D	K	V	K	D	V	L	K
AAT	TCT	CCA	CAT	AAA	GAC	AAA	CCA	TTA	TGG	CTT	GGA
N	S	P	H	K	D	K	P	L	W	L	G
GAG	ACA	AGT	TCT	GGA	TGC	AAC	AGC	GGC	ACA	AAA	GAT
E	T	S	S	G	Y	N	S	G	T	K	D
GTA	TCC	GAT	CGA	TAT	GTT	TCA	GGA	TTT	CTA	ACA	TTA
V	S	D	R	Y	V	S	G	F	L	T	L
GAC	AAG	TTG	GGT	CTC	AGT	GCA	GCC	AAC	AAT	GTA	AAG
D	K	L	G	L	S	A	A	N	N	V	K
GTT	GTT	ATA	AGA	CAG	ACA	ATA	TAC	AAT	GGA	TAT	TAT
V	V	I	R	Q	T	I	Y	N	G	Y	Y
GGT	CTC	CTT	GAT	AAA	AAC	ACT	TTA	GAG	CCA	AAT	CCT
G	L	L	D	K	N	T	L	E	P	N	P
GAT	TAC	TGG	TTA	ATG	CAT	GTT	CAC	AAT	TCT	TTG	GTC
D	Y	W	L	M	H	V	H	N	S	L	V
GGA	AAT	ACA	GTT	TTT	AAA	GTT	GAC	GTT	GGT	GAT	CCA
G	N	T	V	F	K	V	D	V	G	D	P
ACT	AAT	AAA	ACG	AGA	GTC	TAT	GCA	CAA	TGT	ACC	AAG
T	N	K	T	R	V	Y	A	Q	C	T	K
ACA	AAT	AGC	AAA	CAC	ACT	CAA	GGC	AAG	TAT	TAC	AAG
T	N	S	K	H	T	Q	G	K	Y	Y	K
GGC	TCT	TTG	ACA	ATC	TTT	GCA	CTT	AAT	GTT	GGA	GAT
G	S	L	T	I	F	A	L	N	V	G	D

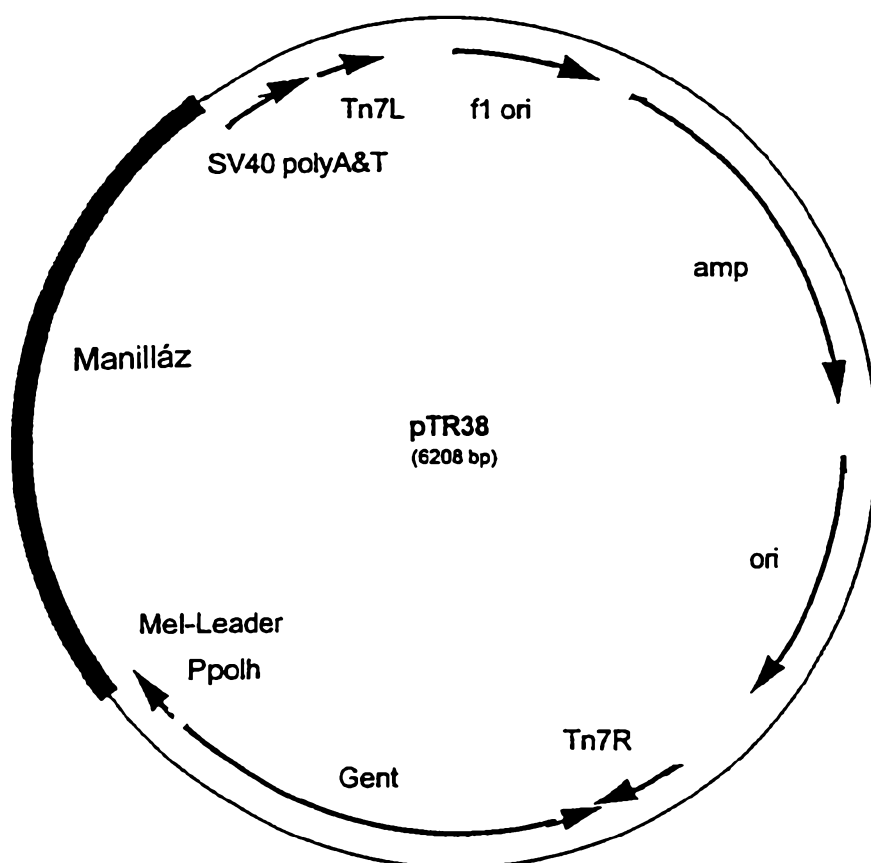
10. ábra folytatása

GAA E	GAA E	GTA V	ACG T	TTA L	AAG K	ATC I	GAT D	CAA Q	TAC Y	GGC G	GGT G
AAA K	AAA K	ATT I	TAT Y	TCA S	TAC Y	ATT I	CTG L	ACA T	CCT P	GAA E	GGA G
GGA G	CAA Q	CTT L	ACA T	TCA S	CAG Q	AAA K	GTT V	CTC L	TTG L	AAT N	GGA G
AAG K	GAA E	TTG L	AAC N	TTA L	GTG V	TCT S	GAT D	CAG Q	TTA L	CCA P	GAA E
CTA L	AAT N	GCA A	GAT D	GAA E	TCC S	AAA K	ACA T	TCT S	TTC F	ACC T	TTA L
TCC S	CCA P	AAG K	ACA T	TTT F	GGT G	TTT F	TTT F	GTT V	GTT V	TCC S	GAT D
GCT A	AAT N	GTT V	GAA E	GCA A	TGY C	AAR K	AAR K				

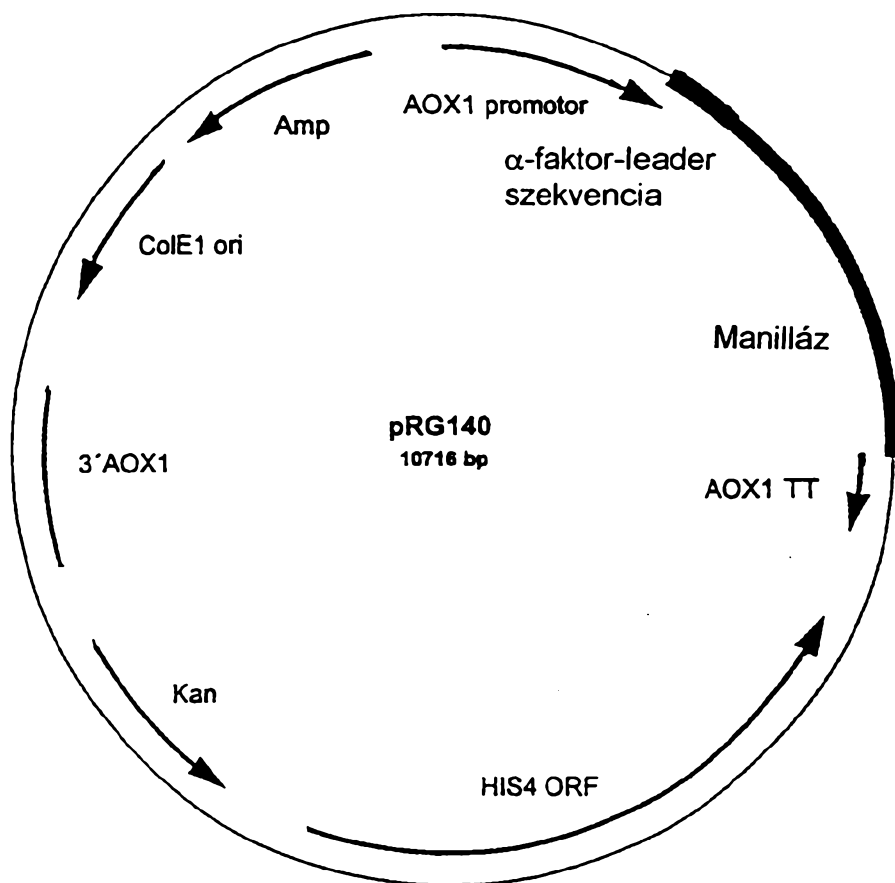
10. ábra folytatása



11. ábra



12. ábra



13. ábra