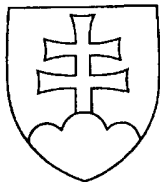


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287496

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2010):

C12N 15/12
C07K 14/435
C07K 16/18
A61K 38/17

- (21) Číslo prihlášky: **1290-2001**
(22) Dátum podania prihlášky: **10. 3. 2000**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **7. 12. 2010**
Vestník ÚPV SR č.: **12/2010**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **99105530.2**
99109503.5
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **18. 3. 1999**
12. 5. 1999
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **EP**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **5. 3. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **03/2002**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **24. 11. 2010**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP00/02117**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO00/56885**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(73) Majiteľ: **MERCK PATENT GmbH, Darmstadt, DE;**

(72) Pôvodca: **Strittmatter Wolfgang, Ober-Ramstadt, DE;**
Güssow Detlef, Darmstadt, DE;
Hofmann Uwe, Alsbach, DE;
Hemberger Jürgen, Aschaffenburg, DE;
Fotev Zisi, Bickenbach, DE;
Scheuble Bernhard, Balkhausen, DE;

(74) Zástupca: **Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Polypeptid z *H. medicinalis*, spôsob jeho prípravy a použitie, farmaceutický prostriedok, polynukleotid, expresný vektor, hostiteľská bunka, protilátka a jej použitie**

(57) Anotácia:

Polypeptid izolovaný z *H. medicinalis* majúci molekulovú hmotnosť približne $12\,000 \pm 1$ kD s biologickou aktivitou inhibítora od kolagénu závislej adhézie krvných doštičiek, ktorý vykazuje v celej dĺžke aspoň z 80 % identitu s aminokyselinovou sekvenciou SEQ.ID.NO.2. Izolovaný polynukleotid so sekvenciou DNA SEQ.ID.NO.1 kódujúci tento polypeptid, expresný vektor obsahujúci túto sekvenciu DNA, hostiteľská bunka obsahujúca tento expresný vektor a expresný systém obsahujúci túto hostiteľskú bunku. Spôsob prípravy tohto polypeptidu kultiváciou uvedeného expresného systému a izoláciou vzniknutého polypeptidu. Protilátka imunošpecifická pre polypeptid so sekvenciou SEQ.ID.NO.2. Farmaceutický prostriedok, ktorý obsahuje uvedený polypeptid. Použitie tohto polypeptidu na výrobu liečiva na liečenie tromboembolických ochorení a ex vivo aplikácie, ako sú pot'ahovanie umelých povrchov, modifikácia vnútroočných šošoviek, kovalentné zosietenie materiálu šošovky. Použitie uvedenej protilátky a polypeptidu pri jeho príprave alebo u liečeného subjektu.

SK 287496 B6

Oblasť techniky

Vynález sa týka polypeptid z *H. medicinalis* na blokovanie adhézie krvných doštičiek, spôsobu jeho prípravy a použitia, farmaceutického prostriedku obsahujúceho tento polypeptid, príslušného polynukleotidu, expresného vektora, hostiteľskej bunky, protilátky a jej použitia.

Doterajší stav techniky

Pri hemostáze alebo trombóze sa krvné doštičky priliepajú na vonkajšiu bunkovú maticu poškodenej cievy alebo pokrývajú povrch poškodenej oblasti. Preventívne zabrániť tomuto významnému počiatocnému stupni patogenézy trombózy a uzatvorenia tepien by malo mať terapeutickú výhodu pri úsilí o prevenciu trombotických ochorení. Kolagén sa považuje za najviac trombogénnu povrchovú zložku a ukázalo sa, že je silný podporovateľ adhézie doštičiek, zrážania a uvoľňovania ich granúl vedúci k navodeniu (Ruggeri, Z. M. a kol.: Seminars in Hematology, 31, str. 229 až 239, 1994) prídavných doštičiek do takej oblasti na vytváranie zrazenín a trombu. Počiatkový kontakt doštičiek s povrchom cievy je sprostredkovaný kolagénom viazaným von Willebrandovým faktorom (vWF) a špecifickým receptorom vWF na doštičky, glykoproteínovým komplexom Ib-V-IX. Okrem toho ADP, epinefrín a cirkulujúce zrážacie faktory podporujú ďalšiu aktiváciu doštičiek, pričom súčasné narastanie trombinovej aktivity prispieva k vytváraniu zosilenej fibrínovej zrazeniny. Vzájomná agregácia doštičiek podporuje tento proces a je hlavne podporovaná fibrinogénom ako sprostredkovateľom, ktorý premostňuje bunky prostredníctvom receptora glykoproteínu IIb/IIIa.

Táto normálna fyziologická reakcia je dosť kritická v priebehu patologického procesu, keď sa doštičky priliepajú na kolagén obnažený v sklerotických poraneniach (Van der Rest M. a kol., FASEB Journal 5, str. 2814 až 2823, 1991) a začínajú vytvárať oklúzie. V závislosti od umiestnenia a od rozsahu môžu mať oklúzie vážne dôsledky, ako je infarkt myokardu, mŕtvica, zápal alebo embólia pľúc.

Ako priamo pôsobiace protitrombotické činidlo blokuje heparín aktivitu trombinu a tak zabraňuje tvoreniu trombov bohatých na fibrín a je v súčasnosti bežne najznámejšou drogou používanou v protitrombotických zá krokoch. Heparín sa používa v širokej miere všade tam, kde ide o nestabilnú angínu a akútny infarkt myokardu. Ale cez široké použitie, zostávajú dosiaľ nevyriešené niektoré závažné problémy, ako je intravenózna aplikácia, potreba anti-trombinu-III ako kofaktora, znížená afinita pre trombín viazaný na zhluky, jeho inaktivácia niektorými plazmovými proteínmi, prípadné vyvolanie trombocytopenie a biologická rôznorodosť. V dôsledku toho neboli dosiaľ prekonané dôsledky používania heparínu v klinickej praxe.

Posledný vývoj heparínu s nízkou molekulovou hmotnosťou prispel k možnosti subkutánnej aplikácie, ale terapeutická výhodnosť oproti štandardnému heparínu je mierna. To rovnaké platí i o iných priamo pôsobiacich antitrombinoch, ako je Hirudin, Hirulog a Warfarin. Ako jeden z hlavných problémov sa zdá zvýšená produkcia trombinu pri antitrombotickom liečení (Rao, A. K. a kol., Circulation 94, str. 389 až 2395, 1996).

Iné nové prístupy sa preto zameriavali na proces protrombinovej aktivácie, ktorá je podporovaná faktorom Xa. Výskum sa zameriaval na konštrukciu vhodných inhibítorov zameraných na tento faktor. Celkovo je nutné konštatovať, že plný terapeutický potenciál intervencie tohto typu nebol dosiaľ realizovaný.

Iná skupina terapeutík je reprezentovaná trombolytickými režimami a vývoj sa zameriava na stafylokinázy, streptokinázy, urokinázy typu plazminogénového aktivátora, tkanivá typu plazminogénového aktivátora a na anizoylovaný plazminogénstreptokinázový aktivátorový komplex. Rozdiely v čase, potrebnom na vyvolanie reperfúzie, sa významne líšia pri každom z týchto trombolytických činidiel, ale pokrok vyjadrený znížením celkovej úmrtnosti je rovnaký pri všetkých týchto produktoch. Okrem toho sú častými komplikáciami reoklúzia alebo predĺžené krvácanie. To môže byť spôsobené pomerne nízkou špecifickosťou pre fibrín a krátkym polčasom týchto zlúčenín v plazme. Bežne sa testujú rôzne aplikačné režimy a kombinácie rôznych fibrinolytických princípov na prekonanie niektorých bežných nedostatkov v trombolytickej terapii. Očakávané zlepšenia sú však skôr malé.

V poslednom čase sa objavila nová skupina pacientov s problémami, ako je akútna trombotická oklúzia a neskorá restenóza, spôsobenými zákrokmi, ako je angioplastia, aterotómia, arteriálne štepovanie alebo stenovanie cievnej steny. Možné terapeutické zákroky zahŕňajú protidoštičkové, antitrombotické a trombolytické stratégie. Rôzne iné činidlá, ako je ticlopidín, pôsobiace ako ADP antagonist alebo ionofór vápnika A-23187, a predovšetkým aspirín majú priamy vplyv na funkciu doštičiek a boli navrhované alebo používané na prevenciu alebo na minimalizáciu zhlukovania doštičiek. Nová látka proti adhézii doštičiek podľa vynálezu by mohla takisto pomôcť prekonávať tieto klinické komplikácie, keď je aplikovaná počas chirurgického zákroku.

Iná komplikácia týkajúca sa tohto problému nastáva, keď sa dostanú umelé povrchy do styku s krvou. Majú potom vzrastajúcu tendenciu vyvolávať trombotické príhody aktiváciou doštičiek a/alebo vyvolávaním zrážania. Tieto javy môžu spôsobovať poruchu cievnych štepov, srdcových chlopní, stentov, katétrov alebo akéhokoľvek iného zariadenia alebo materiálu prichádzajúceho do styku s krvou. Schopnosť proteínu podľa

vynálezu vytvárať netrombogenické povrchy môže byť preto využitá imobilizáciou tohto proteínu na materiáloch a uvedených zariadeniach. Také spracovanie by malo takým materiálom a zariadeniam dodať biokompatibilitu a urobiť ich trombozistentné.

Vzhľadom na obmedzenia súvisiace s dostupnými antitrombotickými činidlami existuje aktuálna potreba nových alternatívnych stratégií a liečebných postupov.

K ďalšiemu zlepšovaniu liečby kardiovaskulárnych porúch môžu prispieť prístupy podľa vynálezu, ktoré priamo narušujú adhéziu doštičiek vyvolanú kolagénom a/alebo vWF faktorom. Niektorými novými inhibítormi, ktoré bránia adhézii doštičiek, sú monoklonálne protilátky zamerané na vWF. Už je známe, že glykoproteínové inhibítory IIb/IIIa môžu byť vhodné na inhibíciu adhézie doštičiek. Niektoré z týchto inhibítorov, ako monoklonálne Ab c7E3 boli už klinicky testované, zatiaľ čo ostatné, ako inhibítory KGD a RGDF sa stále študujú. Ale špecifickosť väčšiny týchto nových inhibítorov nie je príliš dobre preštudovaná, takže spektrum vedľajších účinkov, ktoré budú vyvolané použitím týchto inhibítorov je stále otvorené a vyžaduje starostlivé preskúmanie.

Bohatým zdrojom na testovanie nových zlúčenín, ktoré interferujú s kolagénom vyvolanou adhéziou doštičiek, je príroda prostredníctvom živočíchov sajúcich krv. Z literatúry je známe, že bolo izolovaných niekoľko prírodných inhibítorov: proteín A 65 kD nazývaný calin, izolovaný z *Hirudo medicinalis* (americký patentový spis číslo 5 587360, svetový patentový spis číslo WO 92/07005) (Munro R. a kol., Blood Coagulation and Fibrinolysis 2, str. 179 až 184, 1991) a proteín 16kD (LAPP) izolovaný zo slinných žliaz pijavice *Haementeria officinalis* (americký patentový spis číslo 5 324715). Obidva proteíny boli opísané ako inhibítory agregácie podľa testov statickým skúmaním adhézie doštičiek spôsobovanej kolagénom.

Napriek úspešným dôkazom in vitro, zlyhalo pôsobenie LAPP v niekoľkých dobre zavedených modeloch in vivo (Schaffer L.W. a kol., Arterioscler. Thromb. 13, str. 1593 až 1601, 1993; a Connolly T. M. a kol., Thromb. Haemostas. 69, str. 589, 1993). Mäkký kliešť: *Ornithodoros moubata* takisto obsahuje protidoštičkový proteín (moubatin), ktorý pôsobí v prevencii kolagénom spôsobovanej agregácie doštičiek (Waxman L. a kol., J. Biol. Chem. 268, str. 5445 až 5449, 1993). Iný inhibítor agregácie doštičiek pri krv sajúcej štenici objavili Noeske-Jungblut C. a kol. (svetový patentový spis číslo WO 9309137). Smith a kol. izoloval proteín 50 kDa z hadieho jedu a proteín 19 kDa bol izolovaný zo slín krv sajúcej štenice *Triatoma pallidipennis*. Zistilo sa, že proteín obsahuje faktor, ktorý špecificky inhibuje kolagénom spôsobovanú agregáciu doštičiek. Proteín 19 kDa, nazývaný pallidipin, inhibuje kolagénom spôsobovanú agregáciu doštičiek v plazme. Nezistila sa žiadna inhibícia agregácie stimulovaná inými činidlami (ADP, trombín, tromboxan A2 mimetický U46619, forbolester). Pallidipin nemal žiadny účinok na adhéziu doštičiek kolagénom, inhiboval však uvoľňovanie ATP z doštičiek. Bol v opačnej interakcii s doštičkami a mohol sa spojiť s kolagénom v ich spoločnom celi. Presný mechanizmus pôsobenia a terapeutický zisk z tohto proteínu sa práve skúma. Gan a kol. opisujú eschistatin ako inhibítor viažuci receptor fibrinogénu GPIIa/IIIb (J. Biol. Chem. 283, str. 19827 až 32, 1988).

Napriek tomuto intenzívnemu vývoju, pokračuje snaha vyvinúť, ďalšie protizrážavé a protitrombínové prostriedky, ktoré majú väčšiu účinnosť, pri inhibícii tvorenia zhlukov, aktivácii doštičiek vyvolanej vWF alebo aktivácii endotelových buniek a ktoré by boli použiteľné farmaceuticky a ktoré by sa mohli vyrábať v priemyselne uskutočniteľných množstvách. Pretože žiadny zo známych dosiaľ opísaných proteínov nebol dosiaľ vyvinutý do podoby zlúčeniny s ideálnym terapeutickým profilom, zameral sa vynález na tento problém.

Podstata vynálezu

Prvým aspektom predmetu vynálezu je polypeptid izolovaný z *H. medicinalis* majúci molekulovú hmotnosť približne $12\,000 \pm 1\text{ kD}$ s biologickou aktivitou inhibítora od kolagénu závislej adhézie krvných doštičiek, ktorý vykazuje v celej dĺžke aspoň z 80 % identitu s aminokyselinovou sekvenciou SEQ.ID.NO.2.

Prednostné uskutočnenia tohto aspektu vynálezu zahŕňajú polypeptid definovaný

- s izoelektrickým bodom $\text{pH } 3,7 \pm 0,5$;
- s šiestimi cysteínovými molekulami schopnými vytvárať S-S mostíky;
- s aminokyselinovou sekvenciou SEQ.ID.NO.2.

Druhým aspektom predmetu vynálezu je izolovaný polynukleotid kódujúci uvedený polypeptid.

Prednostné uskutočnenia tohto aspektu vynálezu zahŕňajú

- izolovaný polynukleotid obsahujúci sekvenciu DNA SEQ.ID.NO.1 alebo sekvenciu DNA komplementárnu k sekvencii DNA kódujúcej uvedený polypeptid;
- polynukleotid obsahujúci sekvenciu DNA, ktorá vykazuje v celej dĺžke aspoň 80 % identitu so sekvenciou SEQ.ID.NO.1.

Tretím aspektom predmetu vynálezu je expresný vektor obsahujúci sekvenciu DNA uvedeného polynukleotidu.

Štvrtým aspektom predmetu vynálezu je hostiteľská bunka obsahujúca takýto expresný vektor.

Piatym aspektom predmetu vynálezu je expresný systém obsahujúci takúto hostiteľskú bunku.

Šiestym aspektom predmetu vynálezu je spôsob prípravy polypeptidu definovaného skôr, pri ktorom sa uvedený expresný systém kultivuje za podmienok postačujúcich na produkciu polypeptidu a polypeptid sa izoluje zo supernatantu kultúry alebo z bunkového zvyšku.

Siedmym aspektom predmetu vynálezu je protilátka imunošpecifická pre polypeptid so sekvenciou SEQ.ID.NO.2.

Ôsmym aspektom predmetu vynálezu je farmaceutický prostriedok, ktorý obsahuje definovaný polypeptid a farmaceutický prijateľný nosič alebo jeho excipient. Tento farmaceutický prostriedok môže obsahovať prídavné liečivá zvolené z aspirínu, heparínu alebo streptokinázy alebo ich kombinácie.

Deviatym aspektom predmetu vynálezu je farmaceutický prostriedok definovaný skôr na použitie na liečenie tromboembolických procesov.

Desiatym aspektom predmetu vynálezu je použitie polypeptidu definovaného skôr na výrobu liečiva na liečenie tromboembolických ochorení.

Jedenástym aspektom predmetu vynálezu je použitie definovaného polypeptidu na ex vivo aplikácie zahŕňajúce potaľovanie umelých povrchov, modifikáciu vnútroočných šošoviek na zmiernenie trombogenicnosti materiálu šošovky, kontaktovanie povrchu šošovky a kovalentné zosietenie na modifikáciu materiálu šošovky.

Dvanástym aspektom predmetu vynálezu je použitie uvedených protilátok a uvedeného polypeptidu na ex vivo meranie tohto polypeptidu produkovaného uvedeným spôsobom, alebo u liečeného subjektu.

Inhibitor izolovaný z *H. medicinalis* pôsobí priamo na interakciu kolagén-doštičky, takže inhibuje aktiváciu doštičiek a časnú interakciu doštičky-doštičky.

Dosiaľ sa v literatúre nevyskytol pozitívny príklad, ktorý by naznačil, že použitím skrínungu by sa vylúčili inhibitory agregácie rovnako ako lytické proteíny zo zdrojov prírodne sa vyskytujúcich zlúčenín, ktoré by identifikovali nové antiadhezívne mechanizmy alebo zlúčeniny. Tento prístup sa však využil v tomto vynáleze. Pretože je známych najmenej šesť rôznych doštičkových povrchových glykoproteínov, ktoré sa podieľajú na kolagénovej adhézii a pridávanie niekoľkých zlúčenín odvodených z doštičiek, ako je Willebrandov faktor, fibronektin a trombospondin, sa ukázalo ako nepriame sprostredkovanie adhézie kolagén-doštičky, bolo len málo optimizmu v úsilí začať, identifikovať, nové inhibitory adhézie.

Napriek tomu, bol tento prístup použitý na skrínung slín *Hirudo medicinalis*, pričom sa vedelo, že nie všetky dokumentované alebo neznáme inhibitory odvodené z vWF rovnako ako zlúčeniny pôsobiace priamo na receptory doštičiek by mohli byť vylúčené. Preto bol výsledok skrínungu prekvapením: nový proteín nazvaný Saratin s protiadhezívnou aktivitou pre doštičky, ktorý je možné izolovať z tkanív a sekrétov dobre preskúmanej pijavice druhu *Hirudo medicinalis*.

Vynález sa týka aktívneho polypeptidu Saratinu izolovaného z pijaviek *Hirudo medicinalis*. Proteín bol izolovaný zo slín kombináciou tlakovanej dialýzy a aspoň jedného chromatografického kroku podobného anexovej chromatografii a aspoň jedného kroku vysoko výkonnej reverznej fázovej chromatografie (RP-HPLC). Ukázalo sa, že tlaková dialýza je absolútne rozhodujúca počas získavania Saratinu zo slín, pretože silná koncentrácia slín napomohla k prekonaniu inak výraznej straty bioaktívneho Saratinu. Izolovaný Saratin sa viaže silno na niekoľko kolagénov a blokuje adhéziu doštičiek ku kolagénu potiahnutému takými povrchmi spôsobom závislým od dávky.

Na optimalizáciu bola vyvinutá testovacia kaskáda súčasne dostupných techník na rozlíšenie adhézie doštičiek a agregácie doštičiek: zisťuje sa schopnosť doštičiek spomaľovať alebo zastaviť prítok vláknami, príspevok doštičiek k vytváraniu zhlukov in vitro, adhézie na sklenených guľôčkach, alebo prítoky plné krvi cez filter a adhézia doštičiek antikoagulovanej plazmy bohatej na doštičky na filtroch skladajúcich sa zo sklenených vlákien alebo z kolagénu pod regulovaným tlakovým gradientom.

Proteín (pomenovaný Saratin) je charakterizovaný sekvenciami aminokyselín vyznačenými v sekvencii (SEQ.ID.NO.2) a skladá sa zo 103 aminokyselín, ktoré zaujímajú teoretickú relatívnu molekulovú hmotnosť približne 12068 daltonov $\pm$ 1 kDa. Proteín vykazuje jedinečnú primárnu štruktúru bez významnej podobnosti s inými skôr objavenými sekvenciami. Proteín je bohatý na asparágovú a glutámovú kyselinu, ktoré prispievajú k nízkej izoelektrickej hodnote pH $3,7 \pm 0,5$ molekuly, merané IEF-PAGE.

Analýza SDS-PAGE preukázala silný posun mobility po redukcii proteínu elektroforézou, naznačujúci posttranslačné modifikácie. Sekvenovanie polypeptidu ukázalo šesť cysteínových molekúl, ktoré by mohli tvoriť posttranslačné modifikácie proteínu. Hmotová spektrometria Saratinu elektrónovým lúčom ukázala aktuálnu molekulovú hmotnosť 12061, čo naznačuje, že vo formovaní sekundárnej štruktúry natívnej formy proteínu sa zúčastňujú až tri disulfidické väzby. Inhibitor adhézie podľa vynálezu je nový, pretože sa líši od známych inhibitorov agregácie izolovaných z pijavíc, najmä z Calin alebo LAPP molekulovou hmotnosťou, izoelektrickým bodom, sekvenciou aminokyselín a biologickými aktivitami.

Vynález sa týka rovnako izolovanej DNA zaujímajúcej polynukleotid kódujúci inhibitor adhézie doštičiek odvodený z pijavíc, majúcej sekvencie aminokyselín, ako je ukázané pre proteín. Sekvencie nukleotidov predstavujúce klon cDNA je v SEQ.ID.NO.1. Poloha 1 až 63 sekvencie nukleotidov reprezentuje domnelú

vodcovskú sekvenciu 21 aminokyselín a poloha 64 až 372 obsahuje otvorený čítací rámec kódujúci polypeptid zvyškov 103 aminokyselín a sekvenciu aminokyselín uvedenú pre prírodný proteín v SEQ.ID.NO.2.

Vynález sa týka tiež rekombinantných vektorov, ktoré obsahujú syntetický gén kódujúci inhibítor adhézie doštičiek odvodený z pijavíc podľa vynálezu a hostiteľských buniek, obsahujúcich rekombinantné vektory. Spôsoby získavania a izolovania expresovaných proteínov boli založené na technológiách značenia alebo boli prevzaté z čistiackej schémy vyvinutej pre prírodne sa vyskytujúci Saratin. V závislosti od individuálnych protokolov používaných na extracelulárnu a intracelulárnu expresiu v bunkách kvasinkových, hmyzích, obličkových, v bunkách mláďat chrčkov a v bunkách *E. coli* transformovaných vhodnými vektormi, je potrebné upraviť kroky získavania rekombinantného proteínu zo supernatantu alebo zo sedimentov spôsobmi známymi pracovníkom v odbore. Výborná expresia bola nájdená v *E. coli* ako hostiteľovi, kde periplazmatická expresia prispela začlenením vodcovskej sekvencie pelB. Bolo dosiahnuté získavanie produktov z *Escherichia coli* (*E. coli*) (približne 5 mg/l) po osmolýze a odstredení. V súbežnom experimente bolo použité *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (kultivačný kúpeľ >10 mg/l) s alternatívnym, z kvasiniek prevzatým vektorom, v paralelnom pokuse. Sekretovaný materiál bol izolovaný odstrednením. Čistenie bolo dosiahnuté priechovou filtráciou a ionexovou chromatografiou. Pri ostatných expresiách používajúcich buniek buď COS alebo CHO bola expresia približne 750 ng/ml. Elektroforetickou a chromatografickou analýzou bolo preukázané, že vyčistený rekombinantný materiál je čistý a homogénny a identický so Saratinom odvodenými zo slín, ak dokladá sekvenovanie aminokyselín a stanovenie molekulovej hmotnosti.

Vynález sa týka tiež spôsobu izolácie aktívneho proteínu zo surových slín pijavíc a merania jeho aktivity proti doštičkám statickými a dynamickými skúšobnými spôsobmi, rovnako ako použitie týchto spôsobov na izolovanie rekombinantného proteínu.

Spôsoby výroby Saratinu objasňujú príklady 6, 7, 8 a 13, ale použité spôsoby expresie nie sú obmedzené na tieto príklady. Na expresovanie Saratinu môžu byť rovnako použité napríklad transgénne myši alebo iné organizmy vrátane iných cicavcov.

Proteíny podľa vynálezu zahŕňajú varianty, ktoré konzervujú aktivity objavených sekvencií vrátane fragmentov alebo subjednotiek, prírodne sa vyskytujúcich variantov, alelových variantov, náhodilo generovaných umelých mutantov a zámerných variantov sekvencií, ako je adícia, ktoré konzervuje aktivitu. Fragменты alebo subjednotky sa týkajú ktorejkoľvek časti sekvencie, ktorá obsahuje menej aminokyselín ako úplný proteín, napríklad sekvencie vyradujúcej časti N- alebo C-zakončenia úplného proteínu.

Ďalej sa vynález týka tiež hybridných proteínov, ako sú fúzne proteíny alebo proteíny pochádzajúce z expresie množstva génov v expresnom vektore a môžu zahŕňať polypeptid majúci špecifickú aktivitu objaveného proteínu riadenú peptidovými väzbami na druhý polypeptid. Menovito vynález zahŕňa varianty proteínov, predovšetkým všetky varianty, ktoré sa líšia od izolovaného proteínu iba konzervatívnou substitúciou aminokyseliny. Také konzervatívne substitúcie aminokyselín definoval Taylor a kol. (*J. Mol. Biol.* str. 188 až 233, 1986).

Zahrnuté sú takisto spôsoby používania proteínov na prevenciu alebo oneskorenie aktivácie doštičiek inhibíciou interakcií kolagén/doštičky. Proteín sa hodí na prevenciu, na profylaxiu, na terapiu a na liečenie trombotických chorôb. Na rozdiel od týchto skôr opísaných proteínov, ktoré pôsobia na rôzne povrchové proteíny na doštičke, má proteín podľa vynálezu jedinečný mechanizmus pôsobenia. Viazá sa pevne na povrch kolagénu a jeden z jeho mechanizmov pôsobenia je daný pokrytím špecifických strán kolagénu, ktoré už nie sú k dispozícii pre interakcie a viazanie doštičiek. Typ nového mechanizmu má veľkú prednosť v tom, že počas aplikácie proteínu zostanú doštičky funkčne nedotknuté, takže z tohto ošetrovania je možné očakávať veľmi malé alebo dokonca žiadne krvácanie.

Inou veľkou oblasťou použitia je ošetrovanie rôznych povrchov proteínom, aby sa stali neadhezívne pre doštičky a tým vytvárajú zariadenia kompatibilné s krvou.

Ako bolo uvedené, hodia sa polypeptidy podľa vynálezu ako farmaceuticky účinné zlúčeniny pre farmaceutické prostriedky a kombinácie.

Farmaceutické prostriedky podľa vynálezu môžu prípadne obsahovať prídavné aktívne prísady, ako je aspirín, protizrážavé prostriedky, ako je hirudín alebo heparín alebo trombolytické činidlá, ako je plazminogénový aktivátor alebo streptokináza.

Nové polypeptidy podľa vynálezu môžu vytvárať farmaceuticky prijateľné soli s všetkými netoxickými, organickými alebo anorganickými kyselinami. Ako príklady anorganických kyselín sa uvádzajú kyselina chlorovodíková, bromovodíková, sírová, alebo fosforečná a kovové soli ako natriummonohydrogenortofosfát a káliumhydrogensulfát. Ako organické kyseliny sa príkladne uvádzajú kyseliny mohokarboxylové, dikarboxylové a trikarboxylové, ako je kyselina octová, glykolová, mliečna, pyrohroznová, malónová, jantárová, glutárová, fumarová, jablčná, vínna, citrónová, askorbová, maleínová, hyroxymaleínová, benzoová, hydroxybenzoová, fenyloctová, škoricová, salicylová a sulfónové kyseliny, ako kyselina metánsulfónová. Soli aminokyseliny s karboxylovým zakončením zahŕňajú netoxické karboxylové kyseliny vytvorené s akoukoľvek anorganickou alebo organickou zásadou. Tieto soli zahŕňajú napríklad soli alkalických kovov, ako je sodík a draslík, kovov alkalických zemín, ako je vápnik a horčík, ľahkých kovov skupiny IIIA vrátane hliníka a or-

ganických primárnych, sekundárnych a terciárnych amínov, ako sú trialkylamíny vrátane trietylaminu, prokaínu, dibenzylaminu, 1-etenamínu, N,N'-dibenzyletyléndiamínu, dihydroabietylaminu a N-alkylpiperidínu.

Pojmom „farmaceutický prijateľný nosič“ sa tu rozumie inertné netoxické alebo tekuté plnidlo, riedidlo alebo zapuzdrovací materiál, nereagujúci nepriaznivo s účinnou zlúčeninou alebo s pacientom. Vhodné, výhodne kvapalné nosiče sú v odbore dobre známe, ako sterilná voda, soľanka, vodná dextróza, cukrové roztoky, etanol, glykol a oleje vrátane minerálneho, živočíšneho, rastlinného alebo syntetického pôvodu, napríklad podzemnicového, sójového a minerálneho oleja.

Prostriedky podľa vynálezu sa môžu podávať v jednotkových dávkach obsahujúcich bežné netoxické farmaceuticky prijateľné nosiče, riedidlá, pomocné činidlá a spojivá, ktoré sú typické na parenterálne podávanie.

Pojem „parenterálny“ zahŕňa subkutánne, intravenózne, intraartikulárne a intratracheálne injekčné a infúzne techniky. Vhodné sú tiež iné spôsoby podávania, ako orálne a topické. Parenterálne prostriedky a kombinácie sú najvýhodnejšie podávané intravenózne, buď v bolusovej forme alebo ako konštantné fúzie podľa známych spôsobov.

Tablety a kapsuly na orálne podávanie obsahujú konvenčné excipienty, ako sú spojivá, plnivá, riedidlá, tabletovacie činidlá, mazadlá, dezintegračné činidlá a namáčadlá. Tablety môžu byť potiahnuté v odbore známym spôsobom. Orálne kvapalné prostriedky môžu byť vo forme vodných alebo olejových suspenzií, roztokov, emulzií, sirupov a vodičiek, alebo môžu byť podávané ako suchý produkt na zmiešanie s vodou alebo s iným vhodným nosičom pred použitím. Také tekuté prostriedky môžu obsahovať obvyklé prísady, ako suspenzačné činidlá, emulgátory, nevodné nosiče a konzervačné činidlá. Topické prostriedky môžu byť vo forme vodných alebo olejových suspenzií, roztokov, emulzií, želé a výhodne emulzných masť.

Jednotkové dávky podľa vynálezu môžu obsahovať denné potrebné množstvá proteínu podľa vynálezu, alebo jeho podiely na vytvorenie požadovanej dávky. Optimálna terapeuticky prijateľná dávka a rýchlosť pre daného pacienta (cicavca vrátane ľudí) závisí od mnohých činiteľov, ako sú účinnosť špecifickej použitej účinnej látky, materiál, vek, telesná hmotnosť, celkový zdravotný stav, pohlavie, diéta, čas a cesta podávania, rýchlosť vylučovania, aktivita enzýmu (jednotiek/mg proteínu), účel ošetrovania, to znamená terapia alebo profylaxia a povaha trombotickej ošetrovanej choroby, požadovaná protidoštičková alebo antikoagulačná aktivita.

Preto v prostriedkoch a kombináciách pre liečeného pacienta (in vivo) je farmaceuticky účinná denná dávka proteínu podľa vynálezu približne 0,01 až 100 mg/kg telesnej hmotnosti výhodne 0,1 až 10 mg/kg telesnej hmotnosti. Podľa formy podania môže jedna samotná dávka obsahovať 0,5 až 10 mg trombínového inhibítora. Na dosiahnutie antikoagulačného účinku v mimotelovej krvi je farmaceuticky účinné množstvo peptidu podľa vynálezu 0,2 až 150 mg/l, výhodne 1 až 20 mg/l mimotelovej krvi.

Vynález sa tiež týka implantovateľných alebo mimotelových medicínálnych zariadení na použitie v styku s telesnými kvapalinami, pričom povrchom týchto zariadení je dodaná tromborezistencia potiahnutím imobilizovaným polypeptidom podľa vynálezu. Polypeptid podľa vynálezu sa imobilizuje na medicínálnom zariadení tak, aby bol povrch biokompatibilný a tromborezistentný. Také zariadenie má niekedy povrchové vlastnosti, ktoré navodzujú agregáciu doštičiek, čo je nevýhodné pri zámere ich použitia pre implantovateľné alebo mimotelové medicínálne zariadenia, ktoré majú prichádzať do styku s krvou alebo s inou ľudskou kvapalinou. Ako príklady takých zariadení, ktoré sa spravidla vyrábajú z plastov, sa uvádzajú protézy, umelé orgány, očné šošovky, suture, umelé cievne segmenty, katetre, dialyzátory, rúrky a cievy na vedenie krvi.

Posteriórne zakalenie puzdra („posterior capsule opacification“ =PCO) je bežnou komplikáciou po extrakcii kataraktu cez moderné chirurgické spôsoby a šošovky, ktoré sa na tieto účely používajú. PCO je spôsobená proliferáciou a migráciou šošovkových epitelových buniek posteriorným puzdrom, čím sa znižuje zrková ostrosť. Fyzikálne ošetrenia, ako tiež chemicky modifikované šošovky boli navrhnuté na zníženie PCO. Na zníženie PCO boli navrhnuté heparínové povlaky šošoviek alebo topické heparínové očné kvapky, čo naznačuje, že trombogénne mechanizmy sa podieľajú na vytváraní PCO.

Ukázalo sa, že Saratin má významné prednosti oproti heparínu v prevencii a blokovanií trombogeneckosti. Vynález sa preto ďalej týka povlaku obsahujúceho Saratin, ktorý zníži trombogeneckosť materiálu šošoviek, používaného na refrakčné anteriórne alebo posteriórne puzdro očných implantátov, ktoré sa môžu chirurgicky implantovať do oka. Tento nový typ povlaku čelí problémom so stimulovaným rastom buniek. V kombinácii s ostatnými liečivami, ktoré napríklad spôsobujú smrť buniek, pomáha Saratinový povlak k úplnému predchádzaniu PCO.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1 Separácia zložiek slín. Elúcia Saratinu je vyznačená *.

a) Separačný profil slín po DEAE anexovej výmene. Frakcie Saratinu sa zberajú z piku 3. (príklad 2)

Na osi x je množstvo v ml, na osi y sú jednotky AU. Tlmivé roztoky: A) 20 mM Tris, B) tlmivý roztok A, 1M NaCl. Prietoková rýchlosť 10 ml/min.

b) Rechromatografia zhromaždených frakcií na Mono Q HR5/5. Vzorky sa zhromažďujú z poslednej časti hlavného piketu, ako je naznačené čiarou (príklad 2)

5 Na osi x je množstvo v ml, na osi y je absorbancia 280 nm. Tlmivé roztoky: A) 20 mM Tris, B) tlmivý roztok A, 1M NaCl. Prietoková rýchlosť 1 ml/min.

c) Posledný chromatografický krok semi-preparatívna analytická RP-HPCL pozitívnych frakcií Saratinu zhromaždených z Mono Q HR5/5 (príklad 2). Aktívny Saratin je získaný z hlavného piketu (pik 3).

Na osi x je čas v min., na osi y sú jednotky AU. Tlmivé roztoky: A: H₂O, 0,1 % TFA B: CH₃CN, 0,1TFA.

10 Obr. 2 SDS-PAGE zhromaždených frakcií z RP-HPLC. Pozitívne frakcie Saratinu sú označené * (príklady 2 a 3).

Obr. 3 Expresný vektor *E. coli* pre Saratin (príklad 7).

Obr. 4 Baculo donorový plazmid pre Saratin (príklad 8).

15 Obr. 5 Plná krv bola vystavená umelému kolagénovému povrchu a adhézia doštičiek sa zviditeľnila vyfarbením. Saratin sa použil ako inhibítor (proteín #607) príklad 9. Rýchlosť šmyku: 1300 s⁻¹. Ľudská krv. Kolagén typu III z ľudskej placenty. 30 µl/sklíčko na prekrytie mikroskopickú vzorky (i na obr. 6 a 7 so sklíčkom rozumie sklíčko na prekrytie mikroskopickú vzorky). Prvý obrazec sa týka kontroly, druhý proteínu # 607.

Obr. 6 Inhibícia adhézie doštičiek na sklíčko potiahnuté kolagénom typu III za šmykových podmienok.

20 Porovnanie slín a Saratinu. Príklad 9.

Kolagén typu III z ľudskej placenty.

Sliny # 616 0,11 mg/ml: 30 µl na sklíčko n=4

Proteín # 607 0,11 mg/ml: 30 µl na sklíčko n=2

25 Na osi x sú: v prvom stĺpci kontroly, v druhom stĺpci roztok, v treťom stĺpci sliny # 616, v štvrtom stĺpci proteín # 607. Percentuálny údaj v treťom a štvrtom stĺpci udáva percento inhibície.

Na osi y je pokrytá plocha (%).

Obr. 7 Saratin odhaľuje od dávky závislú inhibíciu väzbovej adhézie doštičiek na sklíčkach potiahnutých kolagénom typu III za šmykových podmienok. (Príklad 9). Proteín # 607. Kolagén typ III z ľudskej placenty Prvý stĺpec sa týka roztoku.

30 Na osi x je koncentrácia [µg/ml], na osi y je % inhibícia.

Obr. 8 Kvasinkový expresný vektor pre Saratin (príklad 13). Vodcovský α-faktor Saratinu.

Vynález bližšie odhaľujú, nijak však neobmedzujú nasledujúce príklady praktického uskutočnenia.

35 Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Skríning inhibítorov adhézie

40 Funkčným základom na skríning štyroch zložiek slín je adhézia doštičiek na kolagéne. Štyri prídavné testy sú vhodné na posúdenie rôzneho pôsobenia antitrombotických drog, ako je skúška AZOCOLL, skúška aktivity amidázy, von Willebrandov test viazania a skúška agregácie doštičiek, na vylúčenie funkčných vlastností, ktoré by ideálne neboli viazané na inhibítor adhézie. Pretože väčšina tu použitých testov sú štandardné skúšky, je potrebné skúšku adhézie doštičiek modifikovať, aby vyhovovala špecifickým potrebám štúdie. Podstata testu: „Horm“ kolagénom (Nycomed) sa potiahnu 96-jamkové doštičky (Nunc) pri použití okysleného kolagénu v koncentrácii 20 µg/ml a doštičky sa inkubujú cez noc. Po premytí doštičiek trikrát PBS sa blokuje zostávajúci povrch jamiek 1 % BSA. Doštičky izolované čerstvo z ľudskej citrónovanej krvi sa pridávajú súčasne s frakciami odvodenými z jednotlivých stĺpcových stupňov. Prípadne sa vykoná predbežná aktivácia doštičiek ich inkubáciou pred použitím TBS v prítomnosti horečnatých iónov. Na porovnanie inhibičnej aktivity sa použije ako štandard surové sliny, štandardizované na celkovú koncentráciu proteínu 200 µg/ml. Ukázalo sa, že test inhibície doštičiek je veľmi chýlostivý na zmeny tlmivého roztoku a zvýšené koncentrácie soli. Hoci boli všetky vzorky spracované ionexovou chromatografiou, ukázalo sa, že priame testovanie frakcií v skúške inhibície je komplikované a nespoľahlivé. Preto boli všetky testované vzorky aplikované na koncentračný stupeň na Centrikonovej báze, ktorý súčasne znižuje iónovú silu a podporuje koncentráciu pred meraním.

55

Príklad 2

Čistenie prírodného inhibítora

60 Vynález používa sliny zhromaždené od *H. medicinalis*, o ktorých je známe, že obsahujú rad bioaktívnych proteínov, ako je hirudín, elastázové inhibítory, kolagenázy a inhibítory agregácie doštičiek, ako je calin (Munro, R. a kol., Blood Coagulation and Fibrinolysis 2, str. 179 až 184, 1991) a LAPP (Schaffer L. W. a

kol., Arterioskler. Thromb. 13, str. 1593 až 1601, 1993). Popri týchto charakterizovaných proteínoch zostáva stále neznáma väčšina približne 80 proteínov zistiteľných SDS-PAGE. Podľa vynálezu sú použité v príklade 1 opísané frakcionované sliny a skriningové stratégie pre nové proteíny, ktoré priamo interferujú s interakciou doštičiek a kolagénu.

Ukázalo sa, že kritickou úlohou je oddelenie aktivity inhibítora adhézie od surových slín, hlavne pre nenávratnú stratu väčšiny inhibičnej aktivity v prvom chromatografickom stupni. Munro R. a kol. odporúča aditívum ako 12 % etanol a dvojmocné katióny, čo situáciu nezlepšuje. Ale vysoká koncentrácia soli slín v kombinácii s celkovo nízkou koncentráciou proteínu (190 až 250 µg/ml) si vyžaduje počiatočnú koncentráciu a stupeň výmeny tlmivého roztoku. Preto sa skúmali rôzne stratégie na obohatenie, koncentrácie alebo výmeny tlmivého roztoku. Tradičná dialýza viedla k úplnej strate aktivity. Väčšina ostatných štandardných techník, ako sú iónomeniče, afinitné stĺpce vylučujúce veľkosti (strata bola nezodpovedajúca živici stĺpca) zlyhali nezávisle od povahy separačnej technológie alebo tlmivého roztoku a použitých aditív. S prekvapením sa ukázalo, že tlaková dialýza 500 ml slín bola úspešnou metódou na skoncentrovanie proteínov slín (približne (30 až 40 krát), ktoré sa súčasne zbavili nežiaducich zložiek tlmivého roztoku. Neočakávane sa stal surový materiál slín, spracovaný týmto spôsobom, ideálnym východiskovým materiálom na ďalšie čistenie a vytáženie bioaktivity antiadhézných zložiek zo slín už nebolo naďalej reálnym problémom. Pretože sa ukázalo, že katexy a afinitné stĺpce sú nedostatočným stupňom čistenia, použili sa slabé anexy ako DEAE-Fastflow alebo EMD-DEAE-Fraktogel. Vyskúšal sa 12 % etanol a dvojmocné katióny, ale výsledky boli podobné s týmito aditívami i bez nich. Ďalšia optimalizácia chromatografických operácií viedla k sekvencii stĺpca DEAE, Mono Q-stĺpca a ako konečný krok k stĺpci reverznej fázy RP18. Optimalizácia chromatografických podmienok sa vykonávala chromatografickým systémom BiaCore používajúcim analytické stĺpce (obchodný produkt spoločnosti Pharmacia). Gradienty na ovládanie stĺpca DEAE, Mono-Q-stĺpce a stĺpcov RP18, sú uvedené na obr. 1a, b, c. Separácia založená na BiaCore bola vyvážená použitím techniky FPLC. Optimalizované bežné podmienky boli priamo prevedené na poloprevádzkové meradlo separácie podľa inštrukcií výrobcu s výnimkou stupňa so stĺpcom RP18, ktorý bol zachovaný technikou Biacore na minimalizáciu strát vyčisteného materiálu. Výťažok vyčisteného proteínu z posledného chromatografického stupňa RP sa vykonal rýchlym vákuovým odstredením. Vzorky, spojené z posledného stupňa RP, sa zhromaždili a analyzovali pomocou SDS-PAGE (obr. 2). Potom sa vzorky resuspendovali v PBS a použili na vykonanie analytických i funkčných testov. Spravidla sa získalo približne 750 µg/l. Saratinu z nespracovaných slín.

Príklad 3

Biochemická charakteristika

Čistenie Saratinu podľa príkladu 1, viedlo v podstate k čistému proteínu so zdanlivou molekulovou hmotnosťou približne 21 kDa, ak je uskutočnené za redukčných podmienok v SDS-PAGE (obr. 2). Kompletná aminokyselinová sekvencia sa získala priamym sekvenovaním prvých 48 aminokyselín vyčisteného proteínu a bola doplnená sekvenovaním niekoľkých vnútorných peptidov pochádzajúcich z enzymatickej degradácie. Úplná sekvencia proteínov je uvedená v SEQ.ID.NO.2.

Proteín sa skladá zo 103 aminokyselín s vyrátanou molekulovou hmotnosťou 12067,9 a s aktuálnou molekulovou hmotnosťou 12061,9, ako bolo doložené hmotovou spektrometriou ES1-Mass spectrometri. Tieto rozdiely teoretickej a nameranej molekulovej hmotnosti naznačujú, že všetkých šesť cysteínov, identifikovaných v Saratine, sa podieľajú na tvorbe mostíkov S-S. Tento poznatok je podporovaný pozorovanou silnou zmenou mobility proteínu, keď je podrobený chromatografii v SDS-PAGE za redukčných alebo neredukčných podmienok. Proteín je okrem toho obohatený kyslými kyselinami, ako je Glu a Asp. Izoelektrické zaostrenie technikou IEF-PAGE (Immobilin) ukázalo izoelektrický bod $\text{pH } 3,7 \pm 0,5$. V porovnávacej štúdii sa ako referenčný použil vyčistený pijavcový proteín a porovnával sa s fyzikálne-chemickými vlastnosťami rekombinovaného Saratinu, odvodeného z exprese baculo, kvasiniek a *E.coli*. Ukázalo sa, že všetky tri proteíny sú v svojich vlastnostiach identické. Charakterizácia proteínu pomocou SDS-PAGE, zviditeľnené Coomassi (obr. 2), alebo strieborným zafarbením a/alebo analýzou Western blot ukázala, že proteín je homogénny a v neglykolyzovanej forme.

Príklad 4

Príprava mRNA a syntéza cDNA

Pripraví sa RNA z lekárskeho pijavce *Hirudo medicinalis* pri použití guanidíntiokyanátového spôsobu. mRNA sa čistí od RNA ako celku pri použití súpravy „Oligotex mRNA kit“ (QIAGEN). Syntetizuje sa cDNA pri použití súpravy „Marathon cDNA Amplification kit“ (CLONTECH). Sekvencia DNA kódujúca Saratin sa napred zosilní použitím oligonukleotidových prajmerov PCR podľa odporúčania výrobcu. Po syntéze cDNA sa k obidvom koncom cDNA pripojí univerzálny adaptor. Sekvencie univerzálnych prajmerov AP1 alebo AP2 sa volia podľa inštrukcií dodávateľa súpravy.

Príklad 5

Zosilnenie a izolovanie Saratinového génu pomocou PCR

Na bezprostrednom konci N-zakončenia reverznej translatovanej aminokyselinovej sekvencie Saratinu sa syntetizujú degenerované prajmery. Tieto prajmery 01 a 02 boli skonštruované na hybridizáciu špecificky na 5'-zakončení cDNA Saratinu. Konštrukcia prajmeru je založená na reverzne translatovanej sekvencii aminokyselín experimentálne určených ôsmimi aminokyselinami N-zakončenia vyčisteného proteínu Saratinu. Obidva prajmery, 01 a 02, sa syntetizujú pri pokiaľ možno nízkej degenerácii a na dodanie prajmerom na kritickom 3'-zakončení rozťahnutia 8 párov báz perfektne súhlasiacich so sekvenciou cDNA Saratinu na zaistenie účinného a špecifického zosilnenia matrice cDNA. Podľa DNA degenerovaná abeceda (IUPAC code) R=A alebo G; M=A alebo C, Y=C alebo T a N=A alebo G alebo C alebo T. Reakcia 3'-RACE PCR sa vykoná pri použití zmesi prajmeru 01 a prajmeru 02 a univerzálneho prajmeru AP1 alebo AP2. Produkty PCR sa klonujú do TA klonovacieho vektoru pCR2.1 alebo pCR Skript SK(+) vektor a sekvenujú sa. Keď sa po sekvenovaní získa niekoľko fragmentov 3'-RACE PCR, získa sa sekvencia génu Saratinu, s výnimkou 5' netranslatovanej oblasti, signálnej peptidovej sekvencie a sekvencie kódujúcej prvých osem aminokyselín z N-zakončenia zrelého proteínu. Na získanie tejto chýbajúcej Saratinovej cDNA sekvencie informácie sa uskutoční experiment 5'-RACE použitím gén špecifického prajmeru zo stredu Saratinovej cDNA a jedného z univerzálnych prajmerov AP1 alebo AP2. Po sekvenovaní niekoľkých z výsledných fragmentov 5'-RACE PCR sa získa úplná sekvencia génu Saratinu. Zosilnením génu Saratinu PCR pomocou gén-špecifických nedegenerovaných prajmerov z obidvoch 3'-zakončení a 5'-zakončení génu Saratinu sa získa plná dĺžka génu Saratinu.

Sekvenovanie DNA sa vykoná s viac ako 15 rôznymi klonmi PCR. Zistila sa však iba jedna významná zmena, ktorá spôsobila zmenu aminokyselinovej sekvencie len v jednom klone. Je veľmi pravdepodobné, že túto zmenu spôsobila PCR. Zistilo sa iných päť tichých zmien, ktoré nespôsobujú zmenu aminokyselinovej sekvencie. Nie je teda pravdepodobné, že boli tieto zmeny spôsobené PCR, pretože rovnaké zmeny boli nájdené v odlišných klonoch.

Gén Saratinu ORF je 37 2bp a obsahuje 21 aminokyselinovú signálnu sekvenciu a 103 aminokyselinovú sekvenciu kódujúcu zrelý proteín. Zistilo sa, že aminokyselinová sekvencia, odvodená z klonu PCR, je totožná so sekvenciou získanou sekvenovaním proteínu, odvodeného z prírodných slín.

Príklad 6

Expresia v bunkách COS a detekcia expresovaného proteínu

Na expresovanie génu Saratinu do cicavčích buniek ako COS alebo CHO, sa gén Saratinu odstrihne z vektora pCR Skript SK(+) pomocou XhoI+XbaI a klonuje sa do expresného vektora cicavčej bunky pCI neo (Promega). Zvolená bola pCI-neo, pretože obsahuje promótor T7 a T3 na expresiu in vivo a neomycínu odolávajúci gén na selekciu G418 a môže byť použitá tak v bunkách COS, ako i CHO. Prídatne k signálnej sekvencii a k sekvencii zrelého proteínu obsahuje inzert sekvenciu Koz na 5'-zakončení na účinnú transláciu a his-koniec („his-tag“) MRGS(H)₆ na 3'-zakončení (C-terminal) na detekciu exprese proteínu, vyčistenie a koncentráciu. Plazmidový konštrukt má názov pNC-31. Použije sa pNC-31 plazmidu DNA na transfekciu buniek COS. Bunky COS, rastúce na dlhšej fáze, sa premyjú dvakrát PBS a rozpustia sa v PBS v koncentrácii 1x10⁷/ml. Pridá sa 12 µg plazmidu DNA (menej ako 50 µl vo vode alebo TE-tlmivý roztoku) do 0,7 až 0,8 ml suspenzie buniek COS a mieša sa v elektroporačnej kyvete. Elektroporácia sa vykonáva 10 minút pri 1,9 kV a zmes sa prenesie na 90 mm-doštičku. Po pridaní 8 ml média DMEM obsahujúceho 10 % FCS a antibiotika sa bunky nechajú rásť 3 dni. Supernatanty a bunky sa použijú na ďalšiu izoláciu proteínu a na detekciu. Expresovaný proteín sa detekuje metódou western blottingu pomocou protilátky anti-MRGS(H)₆. Čistenie sa vykoná chelátmi, ako je NTA alebo imidoctová kyselina imobilizovaná na maticii stĺpca a modifikuje sa kovovými iónmi, napríklad kobaltu, niklu alebo medi.

Príklad 7

Konštrukcia expresného vektora *E. coli* a expresia

I keď je použitie variabilného kodónu v rôznych biologických systémoch, niektoré kodóny sa používajú veľmi zriedkakedy v *E. coli*. Na umožnenie exprese optimalizovanej verzie v *E. coli* sa gén previedol na *E. coli* kodón známymi spôsobmi.

Expresia *E. coli* sa uskutočňuje pomocou modifikovanej verzie plazmidu pASK75, ktorý nesie tet promotorovú oblasť. (Skerra A. a kol., Gene 151, str. 131 až 135, 1994). V podstate sa modifikácia vykoná klonovaním nového spojovníka medzi miestami XbaI a Hind III (obr. 3). Nový spojovník obsahuje vedúcu sekvenciu ompA, iné násobné klonovacie miesto a 6xHis-koniec miesto strep-konca.

Na konštrukciu expresného vektora pre Saratin bolo nutné zaviesť reštrikčné miesta 5'Cla I a 3'Eco47III spôsobom PCR. Preto sa použil 5'-prajmer03 a 3'-prajmer04. Produkt PCR sa napred klonuje do vektorového systému PCR II (Invitrogen) a sekvenuje sa. V druhom kroku sa gén Saratinu klonuje do modifikovaného vektora pASK75 pomocou reštrikčných miest 5'ClaI a 3'Hind III.

Po expresovaní a preukázaní aktivity tohto rekombinantného Saratinu v druhej reakcii PCR sa His-koniec vyberie a štartovací kodón Saratinového génu sa priamo fúzuje do vodcovskej sekvencie omp A. Prajмеры 5'-prajmer05 a 3'-prajmer06 na túto reakciu PCR sú v zozname sekvencií.

Ako príklad na expresiu v *E. coli* sa expresný vektor pRG72 (obr. 3), ktorý obsahuje štruktúrny gén Saratinu fúzovaný do vodcovskej sekvencie ompA transformuje do kompetentných buniek W3110. Bunky sa indukujú po raste do fázy midlog. Po jednej hodine je možné zreteľne zisťovať rekombinantný Saratin.

Príklad 8

Konštrukcia Baculo donorového plazmidu a expresia

Na expresiu Saratinu v expresnom systéme Baculo vírusu sa použije expresný systém Bac-To-Bac™ Baculo Expression System (spoločnosť Gibco Life Technologies). Na získanie selekčného systému bola fúzovaná vodcovská sekvencia včelieho melitínu do génu Saratinu a na zavedenie reštrikčných miest 5'BamHI a 3'KpnI sa vykoná jediná reakcia PCR pomocou prajmerov 5'prajmer07 a 3'prajmer08. Zodpovedajúci produkt PCR sa klonuje do vektora PCRII (Invitrogen) a sekvenuje sa. Potom sa klonuje fúzia Melitin-Saratin do vektora pFastBac pomocou reštrikčných miest 5'BamHI a 3'KpnI a výsledkom je pTD13 (obr. 4). Generácia rekombinantných baculovírusov a expresia Saratinu sa vykoná systémom Bac-To-Bac Expression System. Donorový plazmid pTD13 sa transformuje do kompetentných buniek DH10Bac, ktoré obsahujú bacmid s cieľovým miestom mini-attTn7 a pomocný plazmid. Element mini-Tn7 na donorovom plazmide sa premiestni do cieľového miesta mini-attTn7 na bacmide v prítomnosti transpozičných proteínov poskytnutých pomocným plazmidom. Kolónie, obsahujúce rekombinantný bacmid, sa identifikujú dizrupciou lacZ génu. Vysokomolekulárna mini-prep DNA sa pripraví zo selektovaných *E. coli* klonov obsahujúcich bacmid a táto DNA sa potom použije na transfektovanie hmyzích buniek. Podrobné návody sú v inštrukčnej príručke expresnej súpravy.

Príklad 9

Adhézia doštičiek ku kolagénu za prietokových podmienok (dynamická skúška)

Pri skúške adhézie doštičiek sa nechá prechádzať úplná ľudská krv komôrkou s paralelným prietokom na skúmanie adhézne aktivity doštičiek na kolagénom potiahnuté sklička na prekrytie mikroskopické vzorky (ďalej sa výrazom sklička rozumie sklička na prekrytie mikroskopické vzorky) pri prietoku s veľkým šmykom, (simulácia tepnových podmienok in vivo), ktorú opísali Sakariassen a kol. (Meth. Enz. 169, str. 37 až 70, 1988). Na vyčistené sklička (18x18 mm) sa retušovacou vzduchovou kefkou naniesie ľudský placentový kolagén typu III (Sigma) rozpustený v 50 mmol/l octovej kyseliny. Sklička sa uložia v PBS pri teplote 4 °C cez noc.

Čerstvá predhriata ľudská krv (opatrená antikoagénnym heparínom s nízkou molekulovou hmotnosťou, 20 U/ml) sa predhreje počas 10 minút na teplotu 37 °C pred použitím. Pipetou sa na sklička naniesú proteínové prostriedky podľa vynálezu (30 µl na skličko) a inkubujú sa 10 minút vo vlhkej komôrke pri teplote miestnosti než sa vložia do perfúznej komôrky. Krv sa nechá prechádzať komôrkou (pri teplote 37 °C 5 minút šmykovou rýchlosťou 1 300/s).

Potom sa sklička zložia, opláchnu sa PBS a fixujú sa 30 minút v 0,25 % glutaraldehydu, potom sa vyfarbia farbivom May-Grünwald Giemse. Obr. 9 je typickým príkladom. Extenzívne potiahnutie vyfarbenými doštičkami je zrejme na neošetrenom kontrolnom povrchu. Porovnávací povrch predbežne spracovaný Saratinom ukazuje dramaticky zníženie (o 80 %) väzbu na doštičky.

Adhézia doštičiek sa kvantifikuje svetelným mikroskopom, ako je zrejme na obr. 5 (pri 1000-násobnom zväčšení), pripojeným na počítačový analyzátor obrazu (Leica). Výsledky sú vyjadrené percentom povrchu pokrytého doštičkami a doštičkovými agregátmi.

Inhibičné pôsobenie slín je porovnané s vyčisteným proteínom (obr. 6). Adhézia doštičiek na doštičkách potiahnutých kolagénom typu III pri rýchlosti šmyku 1300/s so surovými slinami (#616) vytvára inhibíciu približne 48 % v porovnaní s kontrolou. Vyčistený proteín (#607); Saratin) dokladá zníženie úsady doštičiek približne o 81 % pri štandardizovaných koncentráciách proteínu. Inhibícia vyvolaná Saratinom sa zvyšuje v závislosti od dávky s vyššími koncentraciami čisteného proteínu (obr. 7).

Príklad 10

Imunizácia a protilátky

S prvou partiou vysoko vyčisteného prírodného proteínu, ktorá bola k dispozícii, sa hneď započalo s imunizáciou zvierat. Imunizačné séra sa zvýšili pri králikoch a na ďalší skríning boli k dispozícii vysoko titrované reakčné činidlá. Dostupné sa stali ďalšie antiséra, keď boli k dispozícii peptidové sekvencie úplného proteínu a syntetizovali sa tri syntetické peptidy (sekvencie aminokyselín 83-103, 13-30, 58-69) pripojené ku KLH štandardným väzbovým postupom a použili sa na imunizáciu. Ustavili sa tri séra zamerané na segment N-zakončenia peptidu a dve séra špecifické pre C-koncové peptidy. S vysoko titrovanými imunitnými sérami, ktoré boli k dispozícii, bolo možné zaviesť a použiť technológie Elisa na sledovanie a kvantifikovanie

vyčistenia prírodne čisteného, rovnako ako rekombinantného proteínu. Tak mohla byť časovo náročná a dosť namáhavá skúška intenzívnej inhibície doštičiek nahradená len potvrdením inhibičného potenciálu konečne vyčisteného proteínu.

5 Príklad 11

Imunitné skúšky na stanovenie väzby Saratinu

- Na potiahnutie 96-jamkových mikrotitračných doštičiek (Nunc) sa použije 50 μ l okysleného Horm-kolagénu (Nycomed) a cez noc sa potiahnu roztokom kolagénu (20 μ g/ml). Pred skúškou sa doštičky premyjú trikrát PBS a inkubujú sa s roztokom BSA (1 %), aby sa zabránilo nešpecifickej adhézii. V sérii zriedení sa pridá 50 μ l Saratinu a inkubuje sa 1 hodinu. Pred použitím sa doštičky omyjú trikrát protilátkou anti-Saratinu na detekciu. Po ďalšej jednoodhodinovej inkubácii sa prebytočná protilátka odstráni a sekundárnym biotínom značená protilátka sa použije na detekciu. Konečný záver sa vykoná cestou farebnej reakcie streptavidínom katalyzovaným POD so substrátmi, ako sú tablety ODB (Dako) meranými pri 490 nm.

15 Príklad 12

Konkurenčná skúška na skríning inhibítorov

- Rekombinantný taggovaný Saratin (His-tag) pripravený podľa príkladu 7 sa porovnáva s natívnym netaggovaným Saratinom z hľadiska väzby ku kolagénu. Spôsobom opísaným v príklade 11 sa pripraví doštičky potiahnuté okysleným Horm-kolagénom (Nycomed). Detekcia sa vykoná protilátkami králičieho anti-Saratinu. Taggovaný a netaggovaný Saratin vykazujú totožné väzbové vlastnosti. Alternatívne sa netaggovaná verzia Saratinu modifikuje biotinylnou (Pierce, biotinylný kit) a porovná sa s nemodifikovaným Saratinom. Väzbové vlastnosti na kolagén sú totožné. Ďalej boli uskutočnené pokusy pri použití biotinylovaného Saratinu s konkurenčným nemodifikovaným Saratinom, peptidov, Saratinu odvodeného zo slín, úplných slín alebo protilátok zameraných na Saratin. Väzba rôznych „konkurentov“ ku kolagénu bola testovaná stanovením väzby biotinylovaného Saratinu pomocou konjugátu streptavidín-POD a ODB-substrátu reakciou k detekcii. Táto skúška s biotinylovaným Saratinom sa používa spravidla na stanovenie koncentrácie Saratinu v slinách (750 μ g/l), epitopového mapovania na Saratin zameraných protilátok, vyhodnocovanie bioaktívneho Saratinu, mutovaného Saratinu. Na preskúmanie potenciálu testu blokovania a neblokovania sa používajú anti-Saratinové protilátky obohatené špecifickými peptidmi Saratinu.

30

Príklad 13

Kvasinkový expresný vektor a expresia

- Ako typický príklad expresie kvasiniek sa používa pichia multi copy expresný systém (Invitrogen). Konštrukcia kvasinkového expresného vektoru je znázornená na obr. 8. Na vytvorenie expresného vektoru pre Saratin sa použije zosilňovacia metóda na generovanie reštrikčných zakončení (5'EcoR I, 3'Not I) kompatibilných s väzbou do príslušného vektora pPIC9K). Nasleduje 5'-prajmer09 a 3'-prajmer10.

- Pred transformovaním sféroplastov *Pichia* sa expresný vektor linearizuje so Sal I. Testuje sa kolónia pre His* Mut*-pozitívne mutanty na zaručenie integrácie Saratinového génu. Typickými podmienkami rastu sú: teplota 28 až 30 °C až do optickej hustoty OD 2-6. Zavedenie expresie sa uskutočňuje po resuspendovaní odstreďovaných buniek v médiu a pridaní metanolu až do konečnej koncentrácie 0,5 % a uchovanie týchto podmienok dlhší čas, ktorým je spravidla 24 hodín. Po typickej šesťdennej fermentácii sa produkt získa zo supernatantu a analyzuje sa spôsobmi SDS-PAGE a ELISA.

45 Priemyselná využiteľnosť

Peptid pôsobiaci proti zrážaniu krvi vhodný na výrobu farmaceutických prostriedkov na ošetrovanie tromboembolických ochorení.

50 Sekvenčný protokol

- <110> Merck Patent GmbH
<120> Protein na blokovanie adhérie doštičiek
<130> Sekvencia saratinu
55 <140>
<141>
<160> 12
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
60 <211> 375

<212> DNA

<213> *Hirudo medicinalis*

<220>

5 <221> CDS

<222> (64) .. (372)

<400> 1

```

atgaagtatt tcttgatttc cttoctttgc ctcgcaagct tgctgatctc aactacttct 60
tca gaa gaa cgt gaa gat tgt tgg acg ttt tac gcg aac aga aaa tat 108
   Glu Glu Arg Glu Asp Cys Trp Thr Phe Tyr Ala Asn Arg Lys Tyr
   1      5      10      15
aca gac ttc gat aaa tct ttt aag aag tcc tct gat ctt gac gaa tgc 156
   Thr Asp Phe Asp Lys Ser Phe Lys Lys Ser Ser Asp Leu Asp Glu Cys
   20      25      30
aaa aaa aca tgt ttc aag acg gag tac tgc tac atc gtt ttt gaa gac 204
   Lys Lys Thr Cys Phe Lys Thr Glu Tyr Cys Tyr Ile Val Phe Glu Asp
   35      40      45
acg gtc aac aag gaa tgt tac tac aat gtc gtt gat ggt gaa gag tta 252
   Thr Val Asn Lys Glu Cys Tyr Tyr Asn Val Val Asp Gly Glu Glu Leu
   50      55      60
gac caa gaa aaa ttt gtt gtc gac gaa aac ttc acg gaa aat tat ttg 300
   Asp Gln Glu Lys Phe Val Val Asp Glu Asn Phe Thr Glu Asn Tyr Leu
   65      70      75
aca gac tgc gag ggt aaa gat gca ggt aat gcg gca ggt aca ggt gac 348
   Thr Asp Cys Glu Gly Lys Asp Ala Gly Asn Ala Ala Gly Thr Gly Asp
   80      85      90      95
gag tca gat gaa gtt gat gaa gat taa 375
   Glu Ser Asp Glu Val Asp Glu Asp
   100

```

10

<210> 2

<211> 103

<212> PRT

<213> *Hirudo medicinalis*

15

<400> 2

```

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

```

<210> 3

20 <211> 23

<212> DNA

<213> Umeľá sekvencia

<220>

25 <223> Opis umelej sekvencie: degenerovaný primér01

	<400> 3	
	gargarmgng argaytggtg gac	23
5	<210> 4 <211> 23 <212> DNA <213> Umelá sekvencia	
10	<220> <223> Opis umelej sekvencie: degenerovaný primér02 <400> 4	
	gargarmgng argaytgctg gac	23
15	<210> 5 <211> 24 <212> DNA <213> Umelá sekvencia	
20	<220> <223> Opis umelej sekvencie: primér03 <400> 5	
25	gcatcgatgg aagaacgtga agac	24
	<210> 6 <211> 23 <212> DNA <213> Umelá sekvencia	
30	<220> <223> Opis umelej sekvencie: primér04 <400> 6	
35	tagcgctttt gacgtcgtcg tca	23
	<210> 7 <211> 26 <212> DNA <213> Umelá sekvencia	
40	<220> <223> Opis umelej sekvencie: primér05 <400> 7	
45	gaagaatgca aggatgagga ttattg	26
	<210> 8 <211> 25 <212> DNA <213> Umelá sekvencia	
50	<220> <223> Opis umelej sekvencie: primér06 <400> 8	
	aagcttctag tcttcgtcaa cttcg	25
55	<210> 9 <211> 94	
60		

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

5 <223> Opis umelej sekvencie: primér07

<400> 9

cggatccatg aaattcttag tcaacgttgc ccttggtttt atggtcgtat acatttctta
catctatgcg gaagaacgtg aagattgttg gact

60

94

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primér08

<400> 10

20 ggtacctcac atatcttcat caac

24

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220> Opis umelej sekvencie: primér09

<223>

<400> 11

30 gcatgcggcc gcctaattctt catcaacttc

30

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220> Opis umelej sekvencie: primér10

<223>

<400> 12

40 gcatgaattc gaagaacgtg aagattg

27

45 PATENTOVÉ NÁROKY

1. Polypeptid izolovaný z *H. medicinalis* majúci molekulovú hmotnosť, približne $12\ 000 \pm 1$ kD s biologickou aktivitou inhibítora od kolagénu závislej adhézie krvných doštičiek, ktorý vykazuje v celej dĺžke aspoň z 80 % identitu s aminokyselinovou sekvenciou SEQ.ID.NO.2.

50 2. Polypeptid podľa nároku 1 s izoelektrickým bodom pH $3,7 \pm 0,5$.

3. Polypeptid podľa nároku 1 alebo 2 s šiestimi cysteínovými molekulami schopnými vytvárať S-S mostíky.

4. Polypeptid podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, s aminokyselinovou sekvenciou SEQ.ID.NO.2.

5. Izolovaný polynukleotid kódujúci polypeptid podľa ktoréhokoľvek z nárokov nároku 1 až 4.

55 6. Izolovaný polynukleotid obsahujúci sekvenciu DNA SEQ. ID.NO.1 alebo sekvenciu DNA komplementárnu k sekvencii DNA kódujúcej polypeptid podľa ktoréhokoľvek z nárokov nároku 1 až 4.

7. Polynukleotid obsahujúci sekvenciu DNA, ktorá vykazuje v celej dĺžke aspoň 80 % identitu so sekvenciou SEQ.ID.NO.1.

8. Expresný vektor obsahujúci sekvenciu DNA podľa nároku 6 alebo 7.

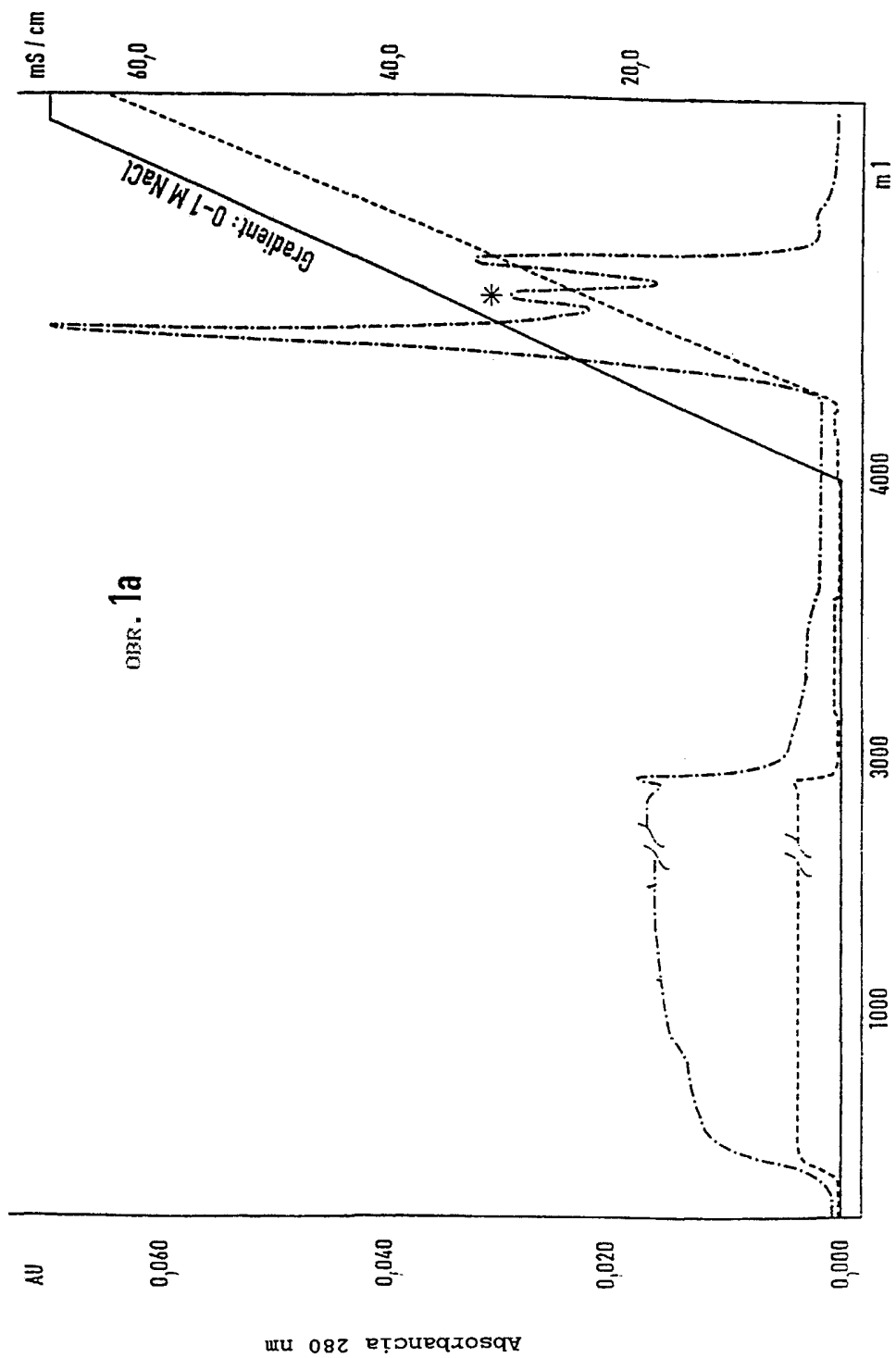
60 9. Hostiteľská bunka obsahujúca expresný vektor podľa nároku 8.

10. Expresný systém obsahujúci hostiteľskú bunku podľa nároku 9.
11. Spôsob prípravy polypeptidu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa expresný systém podľa nároku 10 kultivuje za podmienok postačujúcich na produkciu polypeptidu a polypeptid sa izoluje zo supernatantu kultúry alebo z bunkového zvyšku.
- 5 12. Protilátka imunošpecifická pre polypeptid so sekvenciou SEQ.ID.NO.2.
13. Farmaceutický prostriedok, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje polypeptid podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4 a farmaceuticky prijateľný nosič alebo jeho excipient.
14. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 13 na použitie na liečenie tromboembolických procesov.
15. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 13 alebo 14, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje prídavné liečivá zvolené z aspirínu, heparínu alebo streptokinázy alebo ich kombinácie.
- 10 16. Použitie polypeptidu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4 na výrobu liečiva na liečenie tromboembolických ochorení.
17. Použitie polypeptidu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4 na ex vivo poťahovanie umelých povrchov.
- 15 18. Použitie polypeptidu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4 na ex vivo modifikáciu vnútroočných šošoviek na zmiernenie trombogenicity materiálu šošovky.
19. Použitie polypeptidu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4 na ex vivo kontaktovanie povrchu šošovky.
- 20 20. Použitie polypeptidu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4 na ex vivo kovalentné zosietenie na modifikáciu materiálu šošovky.
21. Použitie protilátok podľa nároku 12 a polypeptidu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4 na ex vivo meranie polypeptidu produkovaného spôsobom podľa nároku 11 alebo u liečeného subjektu.

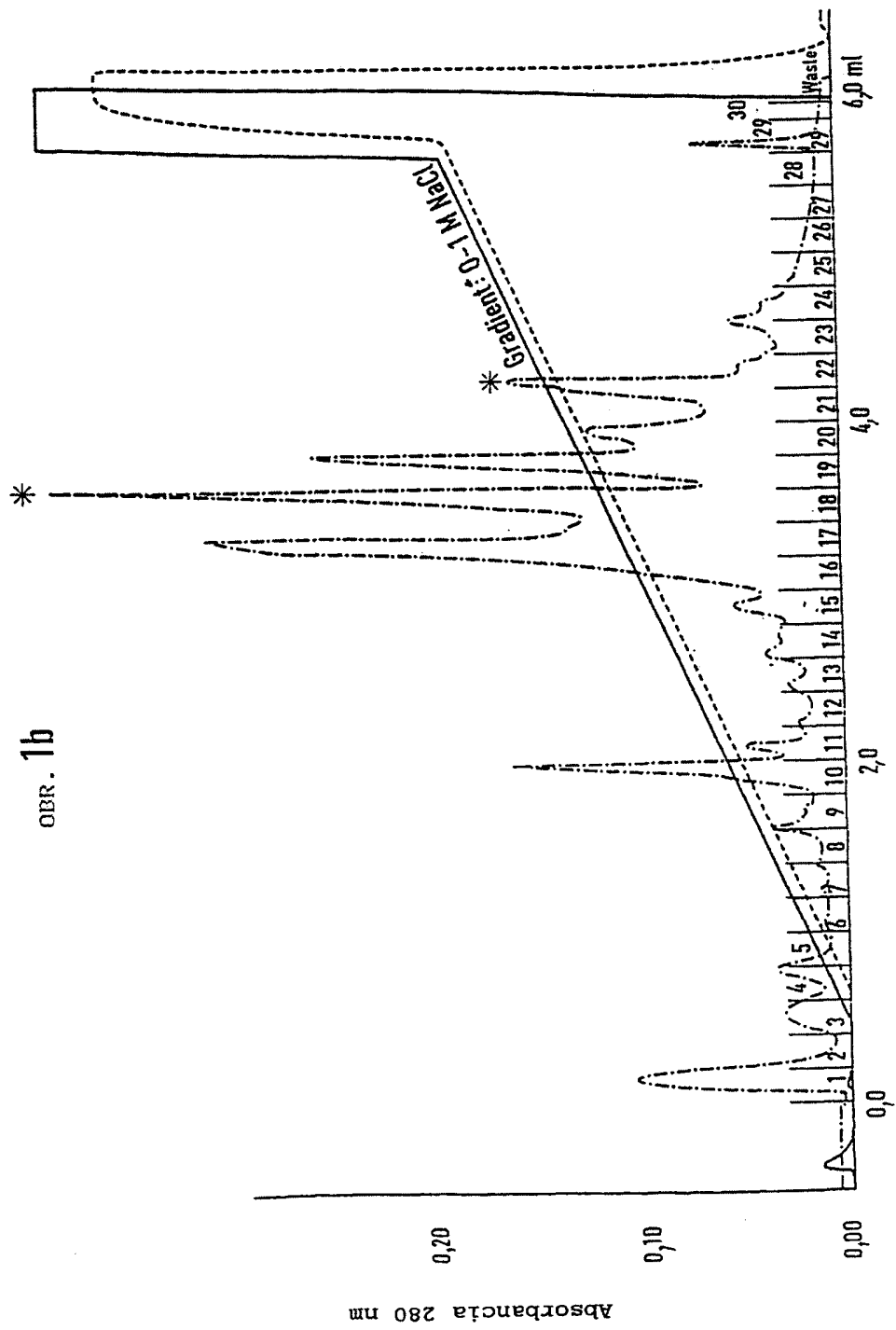
25

9 výkresov

1 / 9

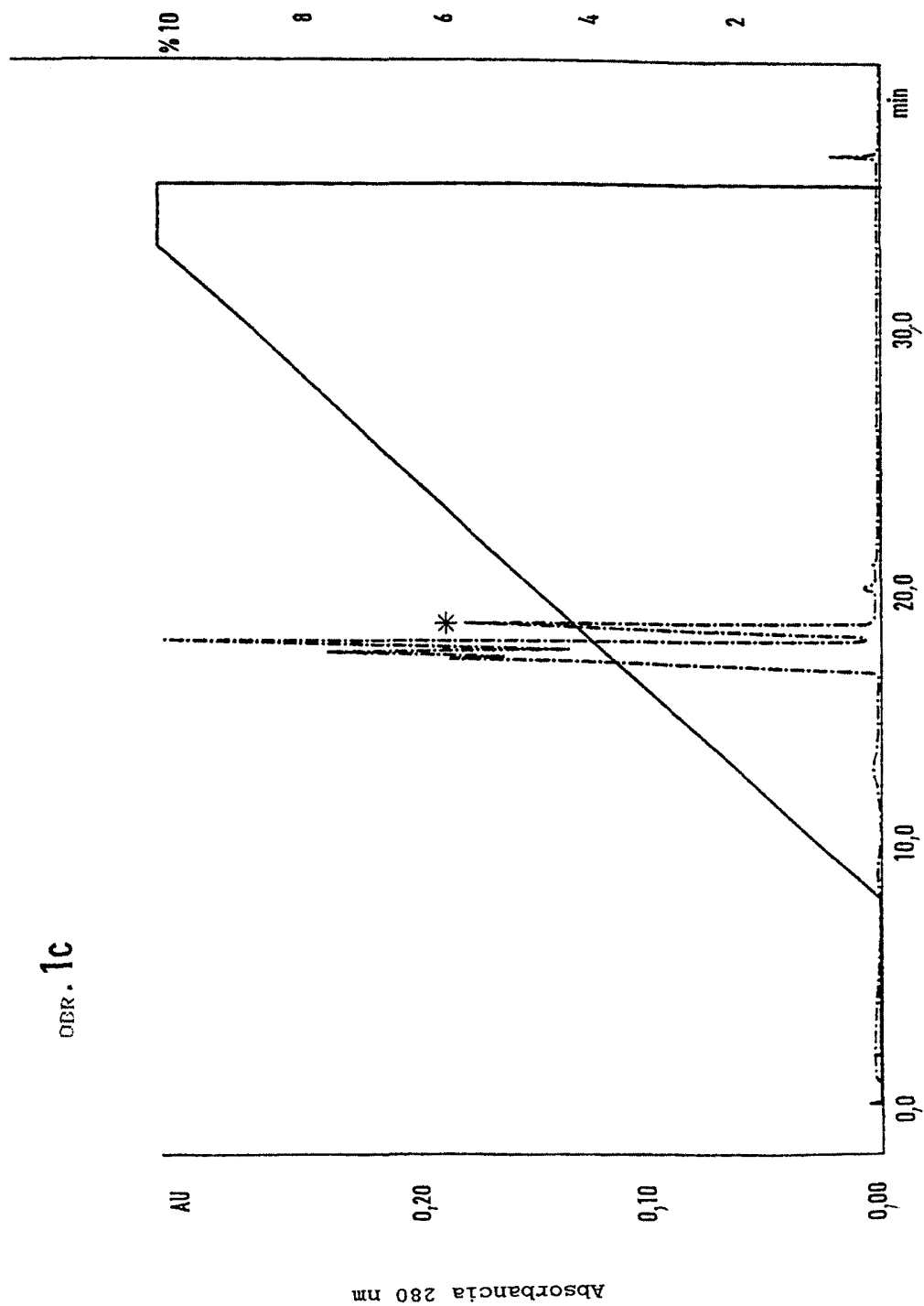


2/9



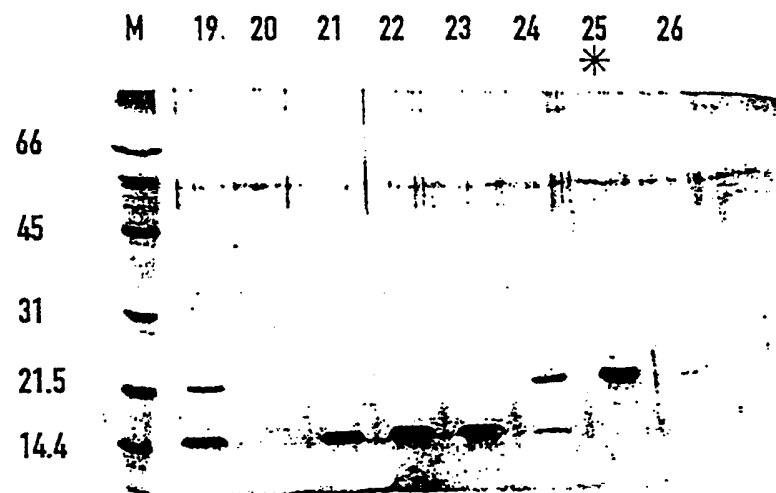
3 / 9

OBJ. 1c



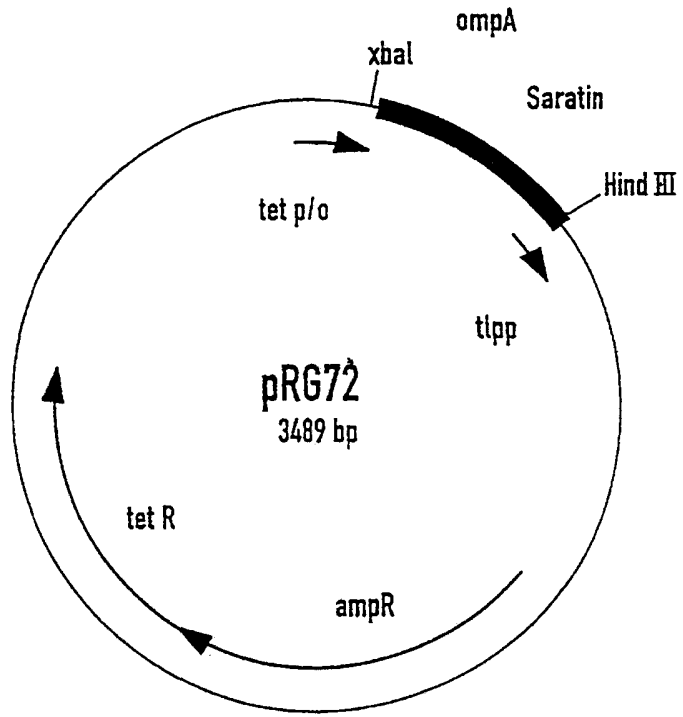
4 / 9

OBR . 2

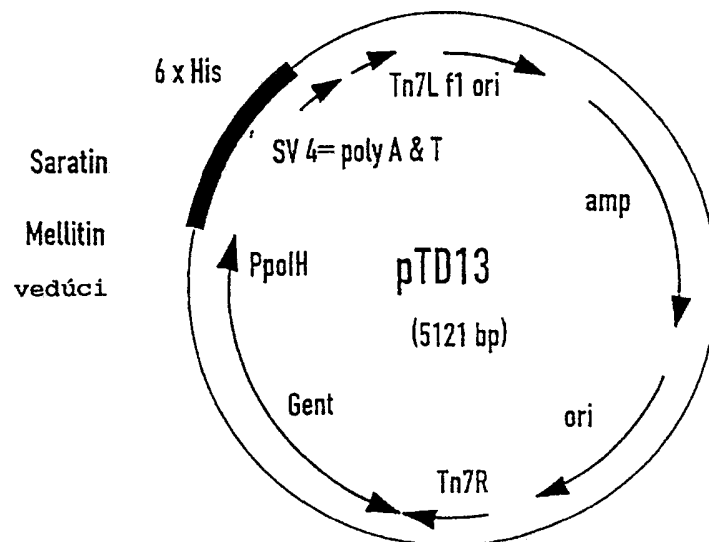


5 / 9

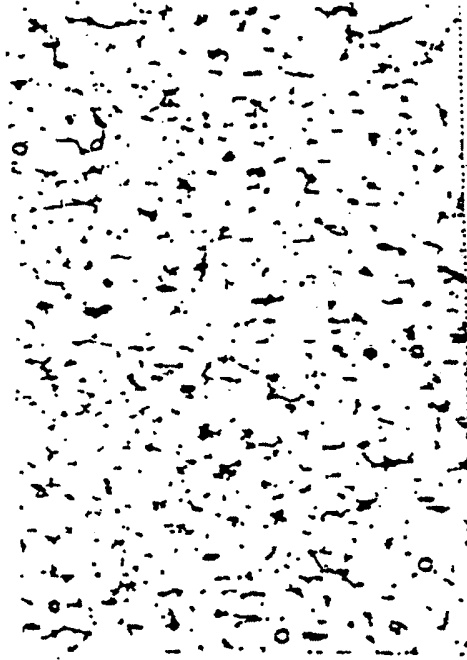
OBR. 3



OBR. 4

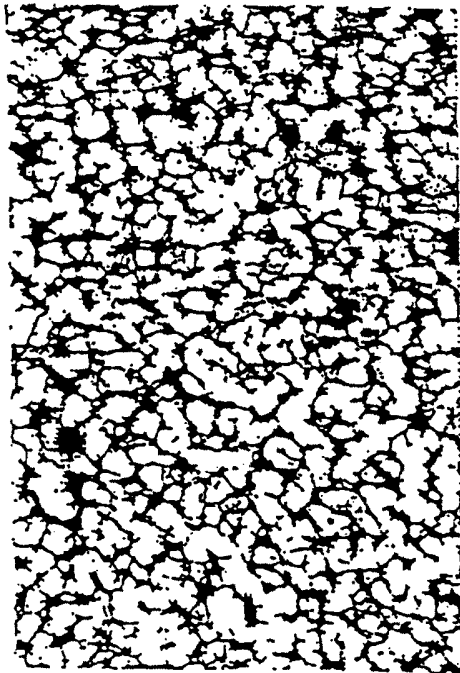


6 / 9



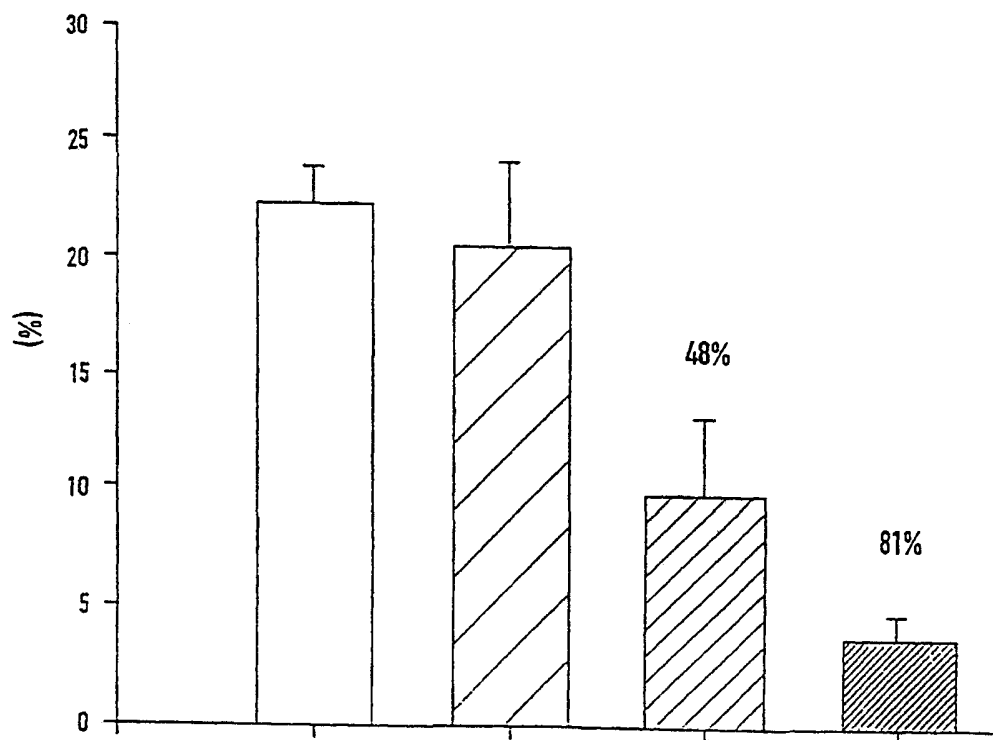
80% inhibición

5
OER.



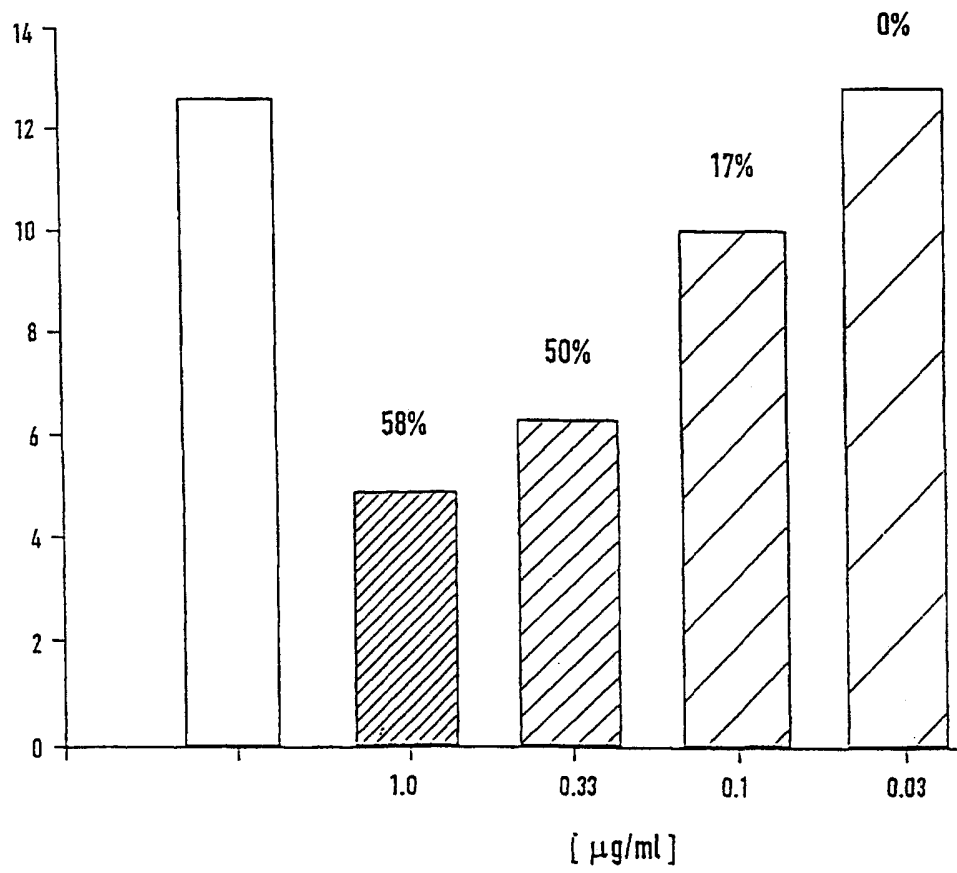
7 / 9

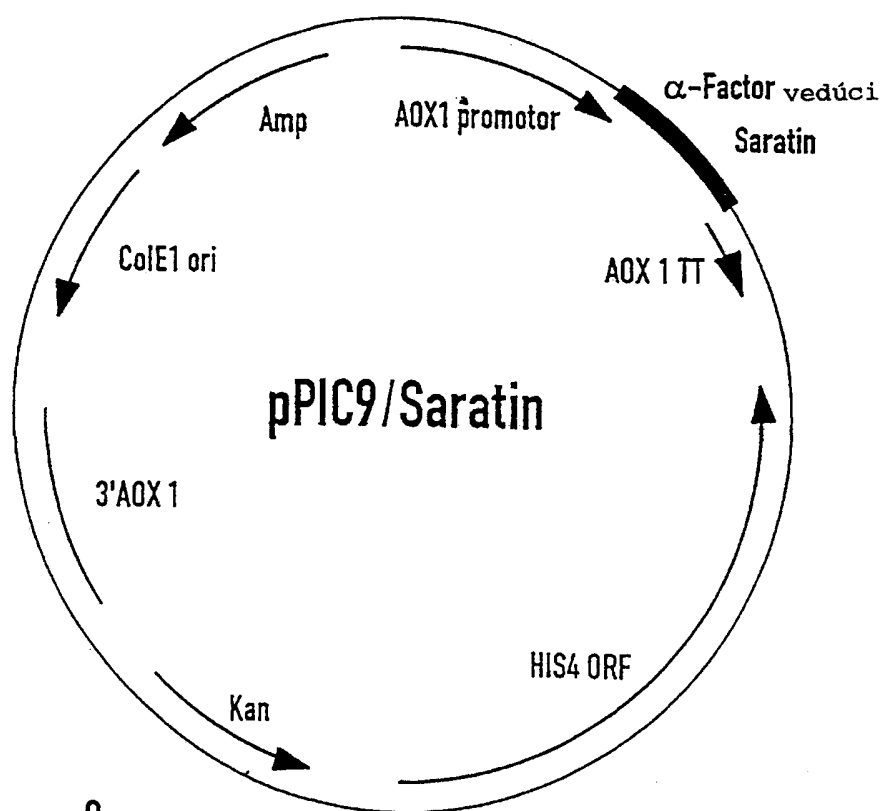
OBR. 6



8 / 9

OBR. 7





OBR. 8