HU 000218890 B

(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

218 890 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 93 02438
(22) A bejelentés napja: 1992. 02. 28.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/662,920 1991. 02. 28. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 92/01636
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/15686

(51) Int. Cl.[7]

C 12 N 15/57
A 61 K 38/36
C 12 N 9/64
C 12 N 5/10

(40) A közzététel napja: 1995. 12. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 2000. 12. 28.

(72) Feltalálók:
Berkner, Kathleen L., Seattle, Washington (US)
Petersen, Lars Christian, Hoersholm (DK)

(73) Szabadalmasok:
Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd (DK)
ZymoGenetics Inc., Seattle, Washington (US)

(74) Képviselő:
DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) **Véralvadást gátló módosított VII faktorok, ezeket kódoló polinukleotid molekulák, polinukleotid molekulával transzfektált emlőssejtek és a véralvadást gátló módosított VII faktorokat tartalmazó gyógyászati készítmények, valamint a készítmények előállítása**

KIVONAT

A találmány tárgyát a véralvadást gátló módosított VII faktorok, valamint ezt tartalmazó gyógyászati készítmények képezik. A VII faktor módosítása abban áll, hogy katalitikus centrumában legalább egy aminosavhelyettesítés, inszerció vagy kiiktatás történt. Ez a módosítás gátolja, hogy a módosított VII faktor a plazma X vagy IX faktort aktiválja, ugyanakkor a szövetfaktort a módosított VII faktor megköti.

A találmány tárgyát képezik a fenti módosított VII faktort kódoló polinukelotidok, valamint ezekkel transzfektált emlőssejtek, továbbá a fenti gyógyászati készítmények előállítása is.

HU 218 890 B

A találmány tárgyát antikoagulánsként használható proteinek képezik. Közelebbről a találmány tárgyát a vér alvadását gátló VII faktor módosított formái, ezeket kódoló polinukleotid molekulák, polinukleotid molekulával traszfektált emlőssejtek és a véralvadást gátló módosított VII faktorokat tartalmazó gyógyászati készítmények, valamint a készítmények előállítása képezik.

A véralvadás egy olyan folyamat, amely különböző vérkomponensek vagy faktorok komplex kölcsönhatásában áll, amely folyamat végső fokon fibrinalvadék létrejöttéhez vezet. Általában azok a vérkomponensek, amelyek abban a folyamatban részt vesznek, amelyre mint koagulációs „kaszkád" hivatkozunk, proenzimek vagy zimogének, enzimesen inaktív proteinek, amelyek egy aktivátor hatására, amely maga egy aktivált alvadékképző faktor, proteolitikus enzimekké alakulnak. Az ilyen átalakuláson átment koagulációs faktorokra általában mint „aktív faktorokra" hivatkozunk, és jelölésük egy „a" jel hozzátételével történik (például VIIa faktor).

A protrombinnak trombinná való alakításához aktivált X faktor („Xa") szükséges, amely a protrombint trombinná alakítja, majd a trombin a fibrinogént fibrinné alakítja, amely végső soron a fibrin alvadékképződéséhez vezet. Az X faktor aktiválásának elősegítésére két rendszer vagy út létezik. A „belső (inherens) út" azokra a reakciókra vonatkozik, amelyek olyan faktorok alkalmazásával vezetnek trombin képződésére, amelyek csak a plazmában vannak jelen. A proteáz által közvetített aktiválások sorozata végső soron létrehozza a IXa faktort, amely a VIIIa faktorral együtt a X faktort Xa faktorrá hasítja. Azonos proteolízis valósul meg a VIIa faktor és kofaktorai, szövetfaktorok révén a vér „külső (exogén) úton" bekövetkező alvadásával. A szövetfaktor egy membránhoz kötött protein, és normális körülmények között nem kering a plazmában. A véredények roncsolódásakor azonban komplexet képezhet a VIIa faktorral, és ezzel katalizálja a X faktor aktiválását vagy a IX faktor aktiválását Ca^{++} és foszfolipid jelenlétében [Nemerson és Gentry, Biochem. *25*, 4020–4033 (1986)]. Míg a két fenti út relatív fontossága a hemosztázisban nem tisztázott, az utóbbi években fény derült arra, hogy a VII faktor és a szövetfaktor döntő szerepet játszanak a véralvadás szabályozásában.

A VII faktor egynyomnyi plazmaglikoprotein, amely a vérben egyláncú zimogénként kering. A zimogén katalitikusan inaktív [Williams és munkatársai, J. Biol. Chem. *264*, 7536–7543 (1989); Rao és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *85*, 6687–6691 (1988)]. Az egyláncú,VII faktor átalakítható a kétláncú VIIa faktorrá in vitro körülmények között Xa faktorral, XIIa faktorral, IXa faktorral vagy trombinnal. Feltételezések szerint a Xa faktor a VII faktor legnagyobb fiziológiás aktivátora. Néhány más, a hemosztázisban érintett plazmaproteinhez hasonlóan a VII faktor is K-vitamin-függő aktivitását tekintve a K-vitamin a fehérje aminoterminálisán fürtszerűen elhelyezkedő több glutaminsav-maradék γ-karboxilálásához szükséges. Ezek a γ-karboxilált glutaminsavegységek szükségesek a VII faktornak foszfolipidekkel való fémekkel kapcsolatos kölcsönhatásához.

A zimogén VII faktor átalakítása az aktivált kétláncú molekulává egy, a molekulának mintegy a közepén elhelyezkedő belső peptidkötés hasításával történik. A humán VII faktorban az aktiválási hasítási hely az Ag_{152}–Ile_{153} [Hagen és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA *83*, 2412–2416 (1986); Thim és munkatársai, Biochem. *27*, 7785–7793 (1988), amely irodalmi hivatkozásokat leírásunkba referenciaként beépítünk]. A marha VII faktora az analóg Arg_{152}–Ile_{153} kötés hasításával aktiválható [Takeya és munkatársai, J. Biol. Chem. *263*, 14868–14877, (1988)]. Szövetfaktor, foszfolipidek és kalciumionok jelenlétében a kétláncú VIIa faktor korlátozott proteolízis mellett gyorsan aktiválja a X vagy IX faktort.

Gyakran szükséges a betegben a koagulációs kaszkád szelektív blokkolása. Antikoagulánsok, például heparin, kumarin, kumarinszármazékok, indándionszármazékok vagy más szerek alkalmazhatók például vesedialízis során, vagy mélyvénás trombózis, vagy elterjedt intravaszkuláris koaguláció [„Idisseminated intravascular coagulation" (DIC)] kezelésére, és más rendellenességek esetén. Például heparinos kezelést vagy testen kívüli citrátionos kezelést (lásd a 4 500 309 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban) alkalmaznak dialízis során a kezelés során fellépő alvadás megelőzésére. Heparint is alkalmaznak a mélyvénás trombózis megakadályozására sebészeti beavatkozásnak kitett betegeken.

Azonban a heparinnal és más antikoagulánsokkal végzett kezelésnek nem kívánt mellékhatásai vannak. A hozzáférhető antikoagulánsok általában az egész szervezetben hatnak, nem pedig specifikusan az alvadék helyén. A heparin például súlyos vérzéseket okozhat. Továbbá a mintegy 80 perces fél életidejének következtében a heparin gyorsan ürül a vérből, ezáltal gyakori adagolást szükségessé téve. Mivel a heparin a III antitrombin (AT III) kofaktora, és az AT III DIC-kezelés során gyorsan ürül, gyakran nehéz a megfelelő heparindózis fenntartása, ez szükségessé teszi az AT III- és a heparinszint folyamatos nyomon követését. A heparin nem hatásos, ha az AT III-ürülés szélsőségesen nagy. Továbbá, a heparin tartós használata növelheti a vérlemezke-aggregálódást és csökkenti a vérlemezkeszámot, valamint az oszteoporózis kifejlődésével is kapcsolatos. Az indándionszármazékok is toxikus mellékhatásokkal bírhatnak.

Az előzőekben röviden ismertetett antikoagulánsokon kívül van néhány természetben előforduló protein is, amelyeket antikoaguláns-aktivitásúnak találtak. Például Reutelingsperger marhaaortából és humán köldökvéna-artériákból antikoaguláns hatású proteineket izolált (lásd a 4 736 018 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban). Maki és munkatársai humán placentából származó antikoaguláns hatású proteineket írnak le a 4 732 891 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban. Ezenkívül javasolták terápiás antikoagulánsként az AT III-at [Schipper és munkatársai; Lancet *1*, (8069); 854–856 (1978); valamint Jordan, a 4 386 025 számú és Bock és munkatársai a 4 517 294 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban].

Továbbra is fennáll azonban az igény olyan javított kompozíciók iránt, amelyek antikoaguláns-aktivitással bírnak, és viszonylag alacsony dózisban adagolhatók, nem váltanak ki a szokásos antikoaguláns-kompozíciókkal kapcsolatos nem kívánt mellékhatásokat. A találmány ezt az igényt elégíti ki olyan antikoagulánsok nyújtásával, amelyek fajlagosan a sérülés helyén hatnak, és amelyek további ezzel kapcsolatos előnyökkel bírnak.

A találmány tárgyát új, antikoaguláns tulajdonságokkal bíró módosított VII faktorok és ezeket tartalmazó gyógyászati készítmények képezik. A VII faktor szekvenciájában legalább egy aminosav módosítását tartalmazza, ahol a módosítást úgy választjuk meg, hogy lényegesen csökkentsük az aktivált VII faktornak a plazma X vagy IX faktor aktiválását katalizáló hatását, és így a módosított VII faktor képes az alvasztóaktivitás gátlására. Az új VII faktor egy módosított aktív hellyel bír, ahol a módosítás legalább egy aminosav helyettesítésében áll, és a módosított forma képes a szövetfaktor kötésére. A módosított VII faktor kompozíciók jellemzően lényegében tiszta formában vannak.

A találmány szerinti módosított VII faktorok betegek kezelésére szolgáló eljárásokban különösen alkalmasak, ha gyógyászati készítményekké formáltak. A fenti faktorok és készítmények beadhatók az erre szoruló, különféle kóros állapotban szenvedő betegeknek a koagulációval kapcsolatos körülmények kezelésére. Így a módosított VII faktor molekulák, amelyek képesek a szövetfaktor kötésére, de lényegesen csökkent képességgel bírnak más, az alvadási kaszkádban részt vevő faktorok aktiválásának katalizálására, hosszabb plazma-féléletidővel bírhatnak, és ennek megfelelően hosszabb időtartamon át fejthetik ki antikoagulánsaktivitásukat más antikoagulánsokhoz hasonlítva. A találmány szerinti módosított VII faktorok gyógyászati indikációi közé tartoznak azok, amelyeket szokásosan antikoagulánsokkal kezelnek, például a mélyvénás trombózis, a tüdőembólia, a gutaütés, az elterjedt intravaszkuláris koaguláció (DIC) és a miokardiális infarktus. Így a betegben az alvadás úgy gátolható, hogy a betegnek az alvadást gátló hatékony mennyiségben adagolunk egy olyan VII faktort tartalmazó kompozíciót, amelyben a Ser_{344}, Asp_{242} és His_{193} katalitikus triádon belül legalább egy aminosavhelyettesítés előfordul.

Jellemzően, ha embernek kívánjuk adagolni, a gyógyászati készítmény egy módosított humán VII faktor proteint és gyógyászati célra alkalmas hordozóanyagokat és puffereket tartalmaz.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint a humán és marha VII faktor Ser_{344} maradék aktív helyét módosítjuk, ezt cseréljük ki Gly-nel, Met-nal, Thr-nal vagy még előnyösebben Ala-nal. Az ilyen helyettesítés elvégezhető önmagában, vagy más, a katalitikus triád egyéb helyein végrehajtott helyettesítésekkel, a katalitikus triád további helyettesíthetőhelyein a His_{193}-at és Asp_{242}-t értjük.

Egy másik szempontját tekintve a találmány egy polinukleotid molekulára vonatkozik, amely két operatívan összekapcsolódó szekvenciakódoló régiót tartalmaz, amelyek egy prepropeptidet és a K-vitamin-függő plazmaprotein gla domenjét, valamint egy gla domen nélküli VII faktor proteint kódolnak, ahol az említett polinukleotid expressziója olyan módosított VII faktor molekulát kódol, amely nem aktiválja szignifikánsan a plazma X vagy IX faktorokat, és amely a szövetfaktor kötésére képes. Az ez által a polinukleotid által kifejezett módosított VII faktor molekula egy biológiailag aktív antikoaguláns, azaz képes a koagulációs kaszkád gátlására, és így a fibrinlerakódás vagy -alvadék képződésének gátlására. A módosított VII faktor kifejezésére a polinukleotid molekulát egy emlőssejtvonalba, például BHK, BHK 570 vagy 293 sejtvonalakba transzfektáljuk. Az így transzfektált emlőssejt ugyancsak a találmány tárgyát képezi.

A következőkben röviden ismertetjük a mellékelt ábrát.

Az ábrán egy Ser_{344} -> Ala módosított VII faktor DNS-szekvencia hordozására szolgáló expressziós vektor konstrukcióját mutatjuk be. Az alkalmazott jelölések a következők: 0–1: az adenovírus 5 0–1 térkép egység szekvenciája; E: az SV40 fokozó; MLP: az adenovírus két nagyobb késői promoterje; SS: összeillesztésihely-készlet; és pA: az SV40 poliadenilációs szignálja a késői orientációban.

Az alábbiakban a találmány egy sajátos megvalósítási módját ismertetjük részletesen. A találmány új módosított VII faktort biztosít, amely antikoagulánsaktivitással bír. A módosított VII faktor lehet zimogén formájában (azaz egyláncú molekulaként) vagy hasítható aktivációs helyén. A módosított VII faktor kompozíciók alkalmasak különböző emlősöknek, különösen embernek való adagolásra a koagulációs kaszkád gátlására. Módosított VII faktor adagolható a betegnek más antikoaguláns vegyületekkel együtt vagy azok helyett.

A VII faktor fontos szerepet játszik a koagulációs kaszkádban, különösen a külső útban. A keringő plazmában inaktív egyláncú zimogén proteinként jelen lévő VII faktor, ha VIIa faktorrá aktiválódott, a szövetfaktorral és kalciumionokkal együtt aktiválja a X faktort Xa faktorrá, és aktiválja a IX faktort IXa faktorrá, amit fibrinalvadék képződése követ.

A találmány lehetőséget nyújt a koagulációs kaszkád ezen eseményei sorozatának gátlására a X és IX faktorok VIIa faktor által való aktiválódásának megelőzésével vagy más módon történő gátlásával. A találmány szerinti VII faktor proteinek egy katalitikus hellyel bírnak, amelynek módosítása révén csökken a VIIa faktor katalitikus aktivitása, míg a molekula megőrzi azt a képességét, hogy a szövetfaktorhoz kötődjön. A módosított VII faktor molekula a szövetfaktorhoz való kötődés tekintetében verseng a natív VII és/vagy VIIa faktorral. Ennek eredményeként a X és IX faktorok aktiválása gátolt.

A találmány egyik szempontját tekintve a VIIa faktor katalitikus aktiválását úgy gátoljuk, hogy a katalitikus centrumban vagy triádban kémiai származékot képzünk. A származékképzés végrehajtható például oly módon, hogy a VII faktort egy irreverzíbilis inhibitorral, például egy szerves foszforvegyülettel, szulfonil-

fluoriddal, egy peptid-halogén-metil-ketonnal vagy egy azapeptiddel reagáltatjuk, vagy aciláljuk. Az előnyös peptid-halogén-metil-ketonok körébe tartozik a PPACK (dansil-Phe-Pro-Arg klór-metil-keton (lásd a 4 318 904 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, amelyet leírásunkba referenciaként építünk), és a DEGRck (dansil-Glu-Gly-Arg klór-metil-keton).

Egy másik szempontot tekintve a VIIa faktor katalitikus aktivitása gátolható azáltal is, ha aminosavakat helyettesítünk, inszertálunk vagy kiiktatunk. Egy előnyös megvalósítási mód szerint az aminosavhelyettesítést a VII faktor katalitikus triádjának aminosavszekvenciáján belül hajtjuk végre, ezt a triádot úgy definiáljuk, mint azt a régiót, amely azokat az aminosavakat tartalmazza, amelyek a VIIa faktor katalitikus helyét hozzák létre. A katalitikus triádban végrehajtott helyettesítések, inszerciók és kiiktatások általában a katalitikus helyet képező aminosavak helyén vagy azzal szomszédosan történnek. A humán és a marha VII faktor proteinekben a katalitikus „triádot" alkotó aminosavak a Ser_{344}, ASP_{242} és His_{193} (az alsó indexként megadott számozás a szekvenciában elfoglalt helyzetet jelöli). Más emlősök VII faktorának katalitikus helyei meghatározhatók a napjainkban hozzáférhető eljárásokkal, köztük például a protein izolálásával és az aminosavszekvencia analízisével. A katalitikus helyek meghatározhatók egy szekvenciának más szerin-proteáz-szekvenciákkal, különösen kimotripszinszekvenciával való összehasonlításával, összehasonlításul olyan szekvenciák használhatók, amelyeknek aktív helyeit előzetesen már meghatározták [lásd például Sigler és munkatársai, J. Mol. Biol. *35*, 143–164 (1968), ezt a hivatkozást leírásunkba referenciaként építjük be], és ebből meghatározzuk az analóg aktív hely aminosavmaradék-sorrendjét.

Az aminosavhelyettesítéseket, -inszerciókat vagy -delécíókat úgy hajtjuk végre, hogy a X és/vagy IX faktorok VIIa faktor által történő aktiválását megelőzzük vagy másként gátoljuk. Az így módosított VII faktor azonban megőrzi arra vonatkozó képességét, hogy az autentikus VII és/vagy VIIa faktorral a koagulációs kaszkádban a szövetfaktorhoz való kötődésben versengjen. Ez a versengés könnyen meghatározható például az itt leírt módon végrehajtott kicsapási vizsgálattal vagy egy kompetíciós kötési vizsgálattal, például olyan sejtvonal alkalmazásával, amely egy sejtfelületi szövetfaktorral bír, ilyen például a humán hólyag J82 karcinóma sejtvonal [Sakai és munkatársai, J. Biol. Chem. *264*, 9980–9988 (1989), amely referenciát leírásunkba hivatkozásként építünk be].

Azokat az aminosavakat, amelyek a VII faktorban a katalitikus helyet képezik, így például a humán és a marha VII faktorban a Ser_{344}, ASP_{242} és His_{193} aminosavakat, helyettesíthetjük vagy kiiktathatjuk. A találmány körén belül előnyös, ha csak egyetlen aminosavat változtatunk meg, így csökkentjük annak a valószínűségét, hogy a molekula antigenitása megnövekszik, vagy hogy a szövetfaktorhoz való kötődési képességét gátoljuk, azonban két vagy több aminosav megváltoztatása (helyettesítése, inszerciója vagy kiiktatása) végrehajtható, és a helyettesítés(ek), inszerció(k) és kiiktatás(ok) kombinációja is végrehajtható. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a humán és a marha VII faktor Ser_{344} aminosavját előnyösen Ala-nal helyettesítjük, de helyettesíthetjük Gly-nel, Met-nal, Thr-nal vagy más aminosavakkal is. Előnyös, ha az Asp-t Glu-nal és a His-t Lys-nel vagy Arg-nel helyettesítjük. Általában olyan helyettesítéseket választunk, hogy a tercier proteinszerkezetet a lehető legkisebb mértékben roncsoljuk. Leírásunkba referenciaként építjük Dayhoff és munkatársai modelljét (Atlas of, Protein Structure 19788, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C.), amely irányvonalul szolgálhat más aminosavhelyettesítések megválasztásában. A humán, marha vagy más faj megfelelő VII faktor szekvenciájának katalitikus helyén az előzőekben leírt egységváltoztatásokat hajthatjuk végre, és vizsgálhatjuk a kapott proteint abban a tekintetben, hogy a katalitikus aktivitás gátlásának kívánt szintjét nyújtja-e, és vizsgálhatjuk antikoagulánsaktivitása tekintetében az előzőekben leírtak szerint. A módosított VII faktor katalitikus aktivitása lényegesen gátolt, általában kevesebb, mint a megfelelő faj vad típusú VII faktora katalitikus aktivitásának mintegy 5%-a, előnyösen kevesebb, mint mintegy 1%-a.

A találmány szerinti proteinek előállíthatók rekombináns DNS-technika alkalmazásával. Általában egy klónozott vad típusú VII faktor DNS-szekvenciát módosítunk úgy, hogy ez a kívánt proteint kódolja. Ezt a módosított szekvenciát azután egy expressziós vektorba inszertáljuk, amelyet ezután gazdasejtekbe transzformálunk vagy transzfektálunk. A magasabbrendű eukarióta-sejtek, különösen a tenyésztett emlőssejtek előnyösek gazdasejtekként. A humán VII faktor teljes nukleotid- és aminosavszekvenciája ismert. A 4 787 950 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, amelyet leírásunkba referenciaként építünk be, rekombináns humán VII faktor klónozását és expresszióját írják le. A marha VII faktor szekvenciáját Takeya és munkatársai [J. Biol. Chem. *263*, 14868–14872 (1988)] ismertetik, közleményüket ugyancsak referenciaként építjük leírásunkba.

Az aminosavszekvencia megváltoztatását különböző eljárásokkal végezhetjük. Módosíthatjuk a DNS-szekvenciát helyspecifikus mutagenezissel. A helyspecifikus mutagenezis technikája szakember számára jól ismert, például Zoller és Smith [DNA *3*, 479–488 (1984)] ismertetik. Így a VII faktor nukleotid- és aminosavszekvenciájának alkalmazásával tetszés szerinti változtatás(ok) vihetők be.

A találmány szerint módosított VII faktor azokat a proteineket foglalja magában, amelyek aminoterminális egysége (gla domén) a K-vitamin-függő IX faktor, X faktor, protrombin, C protein, S protein vagy Z protein-plazmaproteinek valamelyikének gla doménjével helyettesített. A K-vitamin-függő plazmaproteinek gla doménjére az jellemző, hogy gamma-karboxil-glutaminsav-egységekkel bírnak, és a megfelelő gének exon-intron határainak helyzetéhez viszonyítva általában mintegy 30–40 aminosav hosszúságúak a C-terminálisokkal. A heterológ gla doménnel bíró VII faktor

előállítási eljárását a 4 784 950 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetik, amelyet leírásunkba referenciaként építünk be.

A találmány szerint alkalmazott DNS-szekvenciák jellemzően egy prepropeptidet kódolnak a VII faktor proteinaminoterminálisán, ezáltal megfelelő poszttranszlációs feldolgozás (például a glutaminsavegységek gamma-karboxilálása) és a gazdaszervezetből történő kiválasztás érhető el. A prepropeptid lehet a VII faktor vagy egy másik K-vitamin-függő plazmaprotein, például a IX faktor, a X faktor, a protrombin, a C protein vagy az S protein prepropeptidje. Amint az szakember számára nyilvánvaló, a módosított VII faktor aminosavszekvenciáján további módosítások is végrehajthatók, amennyiben ezek a módosítások nem rontják szignifikánsan a proteinnek antikoagulánsként való működési képességét. Például, a katalitikus triádban módosított VII faktor tovább módosítható az aktivációs hasítási helyen, hogy meggátoljuk zimogén VII faktor konverzióját aktivált kétláncú formájává, amint ezt általánosságban leírják az egyidejűleg függő 07/471 313 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben, amelyet leírásunkba referenciaként építünk be.

A találmány megvalósítására alkalmas expressziós vektorok olyan promotert tartalmaznak, amely képes a klónozott gén vagy cDNS transzkripciójának irányítására. Tenyésztett emlőssejtekben való alkalmazásra előnyös promoterek például a vírispromoterek és a celluláris promoterek. A vírispromoterek közé tartozik például az SV40 promoter [Subramani és munkatársai, Mol. Cell. Biol. *1*, 854–864 (1981)], és a CMV promoter [Boshart és munkatársai, Cell *41*, 521–530 (1985)]. Különösen előnyös vírispromoter az adenovírus 2 nagyobb késői promoterje [Kaufman és Sharp, Mol. Cell. Biol. *2*, 1304–1319 (1982)]. A celluláris promoterek közé tartoznak például az egér kappa-gén-promoterje [Bergman és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA *81*, 7041–7045 (1983)] és az egér V_H promoter [Loh és munkatársai, Cell *33*, 85–93 (1983)]. Különösen előnyös celluláris promoter az egér metallotionein-I promoter [Palmiter és munkatársai, Science *222*, 809–814 (1983)]. Az expressziós vektorok tartalmazhatnak egy RNS-összeillesztésihely-készletet is, amely a promotertől a 3'-vég irányában, a VII faktor szekvenciának magának az inszerciós helyétől az 5' vég irányában helyezkedik el. Előnyös RNS-összeillesztési helyek nyerhetők adenovírus és/vagy immunglobulingénekből. Az expressziós vektorok tartalmaznak egy poliadenilációs szignált is, amely az inszerciós helytől a 3' vég-irányában helyezkedik el. Különösen előnyös poliadenilációs szignálok például az SV40-ből származó korai vagy késői poliadenilációs szignálok (Kaufman és Sharp, lásd fent), az adenovírus 5 Elb régiójából származó poliadenilációs szignál, és a humán növekedésihormongén-terminátor [DeNoto és munkatársai, Nuc. Acids. Res. *9*, 3719–3730 (1981)] vagy a humán VII faktor génből vagy a marha VII faktor génből származó poliadenilációs szignálok. Az expressziós vektorok tartalmazhatnak egy nemkódoló vírus vezető (leader) szekvenciát is, például az adenovírus 2 háromrészes leadert, amely a promoter és az RNS-összeillesztési hely között helyezkedik el, valamint egy fokozó (enhancer) szekvenciát, például az SV40 enhancert.

A klónozott DNS-szekvenciákat tenyésztett emlőssejtekbe visszük be, például kalcium-foszfáttal közvetített transzfekció útján [Wigler és munkatársai, Cell *14*, 725–732 (1978); Corsaro és Pearson, Somatic Cell Genetics *7*, 603–616 (1981); Graham és Van der Eb, Virology, *52d*: 456–467 (1973)] vagy elektroporáció val [Neumann és munkatársai, EMBO J. *1*: 841–845 (1982)]. Azon sejtek azonosítására és kiválogatására, amelyek kifejezik az exogén DNS-t, általában az érdeklődésre számot tartó génnel vagy cDNS-val együtt a sejtbe beviszünk egy olyan gént, amely egy megkülönböztethető fenotípust visz át (szelektálható marker). Az előnyös szelektálható markerek körébe tartoznak az olyan gének, amelyek bizonyos hatóanyagok, például neomicin, higromicin és metotrexát iránti rezisztenciát visznek át. A szelektálható marker lehet egy sokszorozható szelektálható marker. Előnyös sokszorozható szelektálható marker a dihidrofolátreduktáz (DHFR) szekvencia. Szelektálható markereket ismertetnek a Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham; MA) szakirodalmi helyen, amelyet leírásunkba referenciaként építünk be. A szelektálható markerek megválasztása szakember ismereteinek körén belül esik.

A szelektálható markerek bevihetők a sejtbe az érdeklődésre számot tartó génnel egyidejűleg egy külön plazmidon, vagy más módon azonos plazmidon is bevihetők. Ha a szelektálható marker és az érdeklődésre számot tartó gén azonos plazmidon vannak, lehetnek különböző promoterek szabályozása alatt vagy egyazon promoter szabályozása alatt, az utóbbi elrendezéssel dicisztronos üzenetet hozunk létre. Az ilyen típusú konstrukciók a szakmában ismertek (ilyet írnak le például Levinson és Simonsen a 4 713 339 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban). Előnyös lehet az is, ha további DNS-t, amely „hordozó-DNS"-ként ismert, adunk az elegyhez, amelyet a sejtbe beviszünk.

Miután a sejtek felvették a DNS-t, a sejteket megfelelő szaporító tápközegben tenyésztjük, jellemzően 1-2 napig, hogy megkezdjük az érdeklődésre számot tartó gén kifejezését. A „megfelelő szaporító tápközeg" kifejezésen olyan tápközeget értünk, amely a sejtek szaporodásához és a módosított VII faktor gén kifejeződéséhez szükséges tápanyagokat és egyéb komponenseket tartalmazza. A tápközegek általában tartalmaznak szénforrást, nitrogénforrást, esszenciális aminosavakat, esszenciális cukrokat, vitaminokat, sókat, foszfolipideket, proteint és növekedési faktorokat. A gamma-karboxilált módosított VII faktor termeléséhez a tápközeg K-vitamint tartalmaz, előnyösen mintegy 0,1 μg/ml és mintegy 0,5 μg/ml közötti koncentrációban. Ezután hatóanyaggal végrehajtott szelekciót végzünk, hogy azon sejtek szaporodását szelektáljuk, amelyek a szelektálható markert stabil módon expresszálják. Azoknál a sejteknél, amelyeket sokszorozható szelektálható markerrel transzfektáltunk, a hatóanyag koncentrációját növel-

hetjük, hogy a klónozott szekvenciák nagyobb kópiaszámát szelektáljuk, ezáltal növelve az expresszió szintjét. A stabilan transzfektált sejtek klónjait ezután a módosított VII faktor expressziója szempontjából szkríneljük.

A találmány tekintetében előnyös emlőssejtvonalak körébe tartoznak a COS–1 (ATCC CRL 1650), a bébihörcsögvese (BHK) és 293 (ATCC CRL 1573; Graham és munkatársai, J. Gen. Virol. *36*: 59–72 (1977)] sejtvonalak. Egy előnyös BHK-sejtvonal a tk⁻ ts13 BHK-sejtvonal [Waechter és Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA *79*:1106–1110 (1982)], amelyet leírásunkba referenciaként építünk be, a továbbiakban BHK 570 sejtekként hivatkozunk ezekre. A BHK 570 sejtvonal az American Type Culture Collection letéti helyen ATCC CRL 10314 letéti számon található. Egy tk⁻ ts13 BHK-sejtvonal is hozzáférhető az ATCC CRL 1632 letéti számon. Ezenkívül számos más sejtvonal használható a találmány körén belül, ilyen sejtvonalak például a patkány Hep I (patkányhepatóma; ATCC CRL 1600), a patkány Hep II (patkányhepatóma; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), humán tüdő (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), CHO (ATCC CCL 61) és DUKX sejtek (Urlaub és Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA *77*: 4216–4220 (1980)].

A találmány szerinti módosított VII faktor tisztítható affinitás kromatográfiás eljárással egy anti-VII faktor-antitestoszlopon. Különösen előnyös kalciumfüggő monoklonális antitestek alkalmazása, amint azt Wakabayashi és munkatársai [J. Biol. Chem. *261*: 11097–11108 (1986)] és Thim és munkatársai, Biochem. *27*: 7785–7793 (1988)] leírták, a fenti közleményeket leírásunkba referenciaként építjük be. További tisztítás érhető el szokásos kémiai tisztítási eljárásokkal, például nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárásokkal. Más tisztítási eljárások, köztük a bárium-citrátos kicsapás is ismeretesek a szakmában, és alkalmazhatók az új, módosított VII faktor tisztítására, amint azt itt leírjuk [lásd általában a Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N. Y., (1982) szakirodalmi helyen].

Gyógyászati felhasználásra a lényegében tiszta, legalább mintegy 90–95%-os homogenitású módosított VII faktor előnyös, még előnyösebb a 98–99% vagy ennél nagyobb homogenitású módosított VII faktor. Ha a módosított VII faktort részlegesen vagy a kívánt homogenitásig megtisztítottuk, ez terápiás célra használható.

A találmány egyik megvalósítási módja szerint a módosított VII faktort aktiválási helyén hasítjuk, hogy kétláncú formára alakítsuk. Az aktiválás végrehajtható szakember számára ismert eljárások szerint, például amint azt Osterud és munkatársai [Biochemistry *11*, 2853–2857 (1972)]; Hedner és Kisiel [J. Clin. Invest, *71*, 1836–1841 (1983)] vagy Kisiel és Fujikawa, Behring, Inst. Mitt. *73*: 29–42 (1983), valamint Thomas a 4 456 591 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban] leírják, ezeket a hivatkozásokat leírásunkba referenciaként építjük be. A kapott módosított „VIIa" faktort ezután az alábbiakban ismertetett módon formáljuk és adagoljuk.

A találmány szerinti módosított VII vagy VIIa faktor molekulák és ezeket tartalmazó gyógyászati kompozíciók különösen hasznosak embereknek történő adagolásra számos intravaszkuláris alvadással járó állapot kezelésére. Például, bár mélyvénás trombózis és tüdőembólia kezelhető a szokásos antikoagulánsokkal, a találmány szerinti módosított VII faktor használható a tromboembóliás komplikációk előfordulásának megelőzésére azonosított nagy rizikójú betegeknél, például olyanoknál, akik sebészeti beavatkozáson mennek át, vagy akik pangásos szívelégtelenségben szenvednek. Mivel a módosított VII faktor szelektívebb, mint a heparin, általában csak a sérülés helyén lévő szövetfaktorhoz kötődik, és mivel a módosított VII faktor nem roncsol más koagulációs proteineket, ha profilaktikusan mélyvénás trombózis megelőzésére használjuk, jóval hatékonyabb lesz, és kevésbé valószínű, hogy vérzési szövődményeket okoz, mint a heparin. A módosított VII faktor dózisa mélyvénás trombózis megelőzésére mintegy napi 50 μg és 25 mg közötti, előnyösen napi 1–10 mg egy 70 kg testtömegű beteg esetén, az adagolást legalább 6 órával a sebészeti beavatkozás előtt kell kezdeni, és legalább addig kell folytatni, míg a beteg járóbeteggé válik. Kialakult mélyvénás trombózis és/vagy tüdőembólia esetén a módosított VII faktor dózisa mintegy 50 μg és 25 mg közötti terhelő dózis, majd ezt követően mintegy 500 μg és 10 mg/nap közötti fenntartó dózis a beteg testtömegétől és az állapot súlyosságától függően. Mivel a vérzési szövődmények valószínűsége alacsonyabb a módosított VII faktor infúziók alkalmazásakor, a módosított VII faktor helyettesítheti vagy csökkentheti a trombektómiával vagy embolektómiával kapcsolatos sebészeti beavatkozás alatt vagy azt követően alkalmazott heparindózist.

A találmány szerinti módosított VII faktor kompozíciók jelentős szereppel bírnak szívembólia megelőzésében és trombotikus roham kezelésében. Mivel a módosított VII faktor vérzési szövődmények kiváltására kevésbé hajlamos és szelektivitása jó, alkalmazható roham áldozatainak kezelésére és megelőzhető alkalmazásával az elzáró artériás trombus terjedése. A módosított VII faktor adagolandó mennyisége betegenként változik a roham természetétől és súlyosságától függően, de a dózis általában az alábbiakban javasolt tartományon belül esik.

A módosított VII faktort tartalmazó gyógyászati készítmények hasznosak akut miokardiális infarktus kezelésére annak a képességnek a folytán, hogy módosított VII faktor in vivo gátolja a koagulációt. A módosított VII faktor adagolható szövetplazminogén-aktivátorral vagy sztreptokinázzal együtt a miokardiális infarktus akut fázisában. Az akut miokardiális infarktus során a betegnek egy, legalább mintegy 1–25 mg módosított VII faktort tartalmazó terhelő dózist adunk, majd ezt követően napi mintegy 500 μg és mintegy 10 mg közötti fenntartó dózist.

A találmány szerinti módosított VII faktor hasznos az elterjedt intravaszkuláris koaguláció (DIC) kezelésében is. Az ebben a kórban szenvedő betegeknél jellemzően elterjedt mikrokeringési trombusok fordulnak elő,

és gyakran súlyos vérzési problémák jelentkeznek, amelyek az esszenciális alvadási faktorok fogyásából következnek be. Szelektivitása folytán a módosított VII faktor nem súlyosbítja a DIC-vel kapcsolatos vérzési problémákat, mint azt más szokásos antikoagulánsok teszik, de a további mikrovaszkuláris fibrinlerakódások képződését késlelteti vagy megakadályozza.

A gyógyászati készítmények lehetnek parenterális, helyi vagy lokális adagolásra szolgáló profilaktikus és/vagy terápiás célra alkalmas készítmények. Előnyösen a gyógyászati készítményeket parenterálisan, azaz intravénásan, szubkután vagy intramuszkulárisan adagoljuk. Így a találmány tárgyát olyan parenterális adagolásra szolgáló készítmények is képezik, amelyek a módosított VII faktor molekulák oldatát tartalmazzák megfelelő hordozóanyagban, előnyösen vizes hordozóanyagban. A vizes hordozóanyagok számos változata használható, például víz, pufferolt víz, 0,4%-os konyhasóoldat, 0,3%-os glicin és hasonló oldatok. A módosított VII faktor molekulák formálhatók liposzómakészítményekké is a sérülés helyére történő szállításra, illetve annak megcélzására. A liposzómakészítményeket általában a 4 837 028, a 4 501 728 és a 4 975 282 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban ismertetik, amelyeket leírásunkba referenciaként építünk be. A készítmények szokásos, jól ismert sterilezési eljárásokkal sterilezhetők. A kapott vizes oldatok használatra csomagolhatók vagy aszeptikus körülmények között szűrhetők és liofilizálhatók, a liofilizált készítmények adagolás előtt steril vizes oldattal kombinálandók. A készítmények tartalmazhatnak gyógyászatilag elfogadható segédanyagokat, amelyek a fiziológiás körülmények megközelítéséhez szükségesek, például pH-beállító vagy pufferolószereket, a tonicitást beállító szereket és hasonló anyagokat, például nátrium-acetátot, nátrium-laktátot, nátrium-kloridot, kálium-kloridot vagy kalcium-kloridot. A készítményekben a módosított VII faktor koncentrációja széles körön belül változhat, azaz mintegy 0,5%-nál kisebb mennyiségtől, általában 1 tömeg% vagy legalább 1 tömeg% mennyiségtől 15 vagy 20 tömeg% mennyiségig, a koncentrációt elsősorban például a folyadéktérfogattól és a viszkozitástól függően választjuk meg, összhangban a kiválasztott sajátos adagolási móddal.

Így például intravénás infúzió céljára szolgáló jellemző gyógyászati készítmény állítható elő 250 ml steril Ringer oldatból és 10 mg módosított VII faktorból. A parenterálisan adagolható hatóanyagok előállítására szolgáló adott módszerek szakember számára ismertek, részletes leírásuk szerepel például a Remington's Pharmaceutical Science, 16. kiadás, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1982 szakirodalmi helyen, amelyet leírásunkba referenciaként építünk be.

A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti gyógyászati készítmények előállítása is, amit a találmány szerinti módosított VII faktorok és fiziológiás szempontból elfogadható hordozóanyagok formálásával végzünk.

A módosított VII faktor molekulákat tartalmazó készítmények adagolhatók profilaktikus és/vagy terápiás céllal. Terápiás alkalmazás esetén a készítményeket a betegségtől már szenvedő betegnek az előzőekben leírt módon adjuk olyan mennyiségben, hogy a betegséget és szövődményeit gyógyítsa, vagy legalább részben megszüntesse. Az ennek a célnak az elérésére szükséges mennyiséget „terápiásan hatékony dózis"-ként definiáljuk. Az ilyen alkalmazásra hatékony mennyiség a betegség vagy sérülés súlyosságától, valamint a beteg testtömegétől és általános egészségi állapotától függ, azonban általában mintegy 0,05 mg és mintegy 25 mg módosított VII faktor/nap 70 kg testtömegű beteg esetén, szokásosabban a dózis mintegy 0,5 mg és mintegy 10 mg közötti mennyiségű módosított VII faktor naponta. Figyelembe kell azonban venni, hogy a találmány szerinti anyagokat általában súlyos kórok vagy sérüléses állapotok esetén, azaz életet fenyegető vagy potenciálisan életet fenyegető helyzetekben alkalmazzuk. Ezekben az esetekben, tekintetbe véve az idegen anyagok minimalizálását és a módosított humán VII faktor immunogenitásának általános hiányát, lehetséges és kívánatos lehet a kezelőorvos számára, hogy ezeket a módosított VII faktor kompozíciókat jelentős feleslegben adagolja.

Profilaktikus alkalmazás esetén a módosított VII faktor készítményeket a kóros állapotra vagy sérülésre érzékeny vagy másként veszélyeztetett betegnek saját antikoagulatív képessége fokozására adagoljuk. Az ilyen mennyiséget „profilaktikusan hatékony dózis" megjelöléssel illetjük. Az ilyen alkalmazás esetén a pontos mennyiség függ a beteg egészségi állapotától és testtömegétől, de általában mintegy 0,1 mg és mintegy 25 mg közötti mennyiség egy 70 kg-os beteg esetén, szokásosabban mintegy 0,5–10 mg egy 70 kg-os beteg esetén.

A készítmények egyszeri vagy többszöri adagolással adhatók be a kezelőorvos által megválasztott dózisszint és adagolási rend alkalmazásával. Az olyan járóbetegeknek, akiknél napi szint fenntartása szükséges, a módosított VII faktor adagolható folyamatos infúzióként például hordozható szivattyúrendszer alkalmazásával. A gyógyászati készítménynek minden esetben a beteg hatékony kezeléséhez elegendő mennyiségű találmány szerinti módosított VII faktort kell nyújtania.

A következőkben a találmányt példákban mutatjuk be a korlátozás szándéka nélkül.

I. példa

Ser_{344}->Ala_{344} VII faktor kifejezése

A Ser_{344}->Ala VII faktor aktívhely-mutánst, FVII plazmid (565+2463)/pDX plazmid (lásd a 4 784 950 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban, amelyet leírásunkba referenciaként építünk be; az American Type Culture Collection letéti helyen 40205 számon letétbe helyezve) XbaI-gyel és KpnI-gyel történő emésztésével, majd a kapott, a $szerin_{344}$-et kódoló régiót tartalmazó 0,6 kb fragmentum kinyerésével hozzuk létre oly módon, hogy a fenti fragmentumot XbaI, KpnI emésztett M13mp19be klónozzuk az ábrán bemutatott módon. Ezt a műveletet és az alábbiakban leírásra kerülő további lépéseket általában szokásos módon hajtjuk végre (például a Maniatis

és munkatársai (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982) által leírt módon, amelyet leírásunkba referenciaként építünk be.

A mutagenezist M13 templáton hajtjuk végre Zoller és Smith eljárása szerint (lásd fent), a mutagén ZC1656 (5' TGG GCC TCC GGC GTC CCC CTT 3' oligonukleotid és a ZC87 (5' TCC CAG TCA CGA CGT 3') „univerzális" második primer alkalmazásával. A reakciótermékeket kinázzal kezelt ZC1656 alkalmazásával szkríneljük. A pozitív plakkokat kiemeljük és templát DNS-t készítünk, és ezt az 1077 PstI helytől az 1213 KpnI helyig szekvenáljuk. A szekvenciaanalízis megerősíti a kívánt mutáció jelenlétét. A mutáns klón jelölése 1656.

Az 1656 jelölésű klón alkalmazásával ezután expressziós vektort konstruálunk. A mutagenizált szekvenciát az M13 vektorból tr0,14 kb PstI-KpnI fragmentumként izoláljuk. Ezt a fragmentumot a FVII (565+2463)/pDX 1,7 kb Hind III-XbaI fragmentumába, a FVII(565+2463/pDX 0,5 kb XbaI-PstI fragmentumába és a FVII(565+2463/pDX 4,3 kb KpnI-HindIII fragmentumába ligáljuk az ábrán bemutatott módon. A kívánt mutáns szekvencia jelenlétének igazolására a mutánst és vad típusú klónokat PstI-gyel emésztjük, és egy M13-ba inszertált VII faktor mutánst KpnI-gyel és XbaI-gyel emésztünk, az emésztett DNS-ből Southern blotokat készítünk, és ezeket izotóppal jelzett ZC1656-tal vizsgáljuk.

Bébihörcsögvese BHK 570 sejtvonalat (az American Type Culture Collection letéti helyen a 10314 letéti számon letétbe helyezve) az 1656 expressziós vektor két izolátumával (jelölésük: #544 és #545) transzfektáljuk. A sejteket úgy készítjük, hogy BHK 570 sejttenyészettel összefüggően fedett 10 cm-es lemezről 1:10 arányú hígítással 5 db 10 cm-es lemezt oltunk be, a lemezek tápközege nem szelektív tápközeg (Dulbecco által módosított Eagle-féle tápközeg (DMEM), amely 10% magzati borjúszérumot és 1% PSN antibiotikumelegyet (GIBCO Life Technologies, Gaithersburg MD) tartalmaz]. 24 óra múlva, amikor a tápközegnek az összenőtt sejtek által való fedettsége eléri a 20–30% értéket, kotranszfekciót végzünk egy olyan expressziós vektor izolátumával, amely az 1656 mutánst kódolja egy p486 plazmiddal, amely magában foglalja az Adenovírus 5 ori-t, az SV40 enhancert, az Adenovírus 2 nagyobb késői promoterjét, az Adenovírus 2 háromrészes leaderjét, az 5' és a 3' összeillesztési helyeket, a DHFR^r cDNS-t és a pML–1 SV40 poliadenilációs szignálját [Lusky és Botchan, Nature *293*, 79–81 (1981)], továbbá 10 μg hordozó DNS-t (ultrahanggal kezelt lazacsperma-DNS), amint az az 1. táblázatban látható. A DNS-t a 15 ml-es csőbe adjuk, majd 0,5 ml 2 x HEPES-t (25 g Hepes, 40 g NaCl, 1,8 g KCl, 0,75 g $Na_2HPO_4.2H_2O$, 5 g dextróz desztillált vízzel 2,5 litere hígítva, majd a pH-t 6,95–7,0-ra beállítva) adunk a csőbe, és az oldatokat elegyítjük. Az egyes csövekben lévő DNS-t 0,5 ml 0,25 mol/l-es $CaCl_2$ hozzáadásával kicsapjuk, miközben a DNS/HEPES oldaton Pasteur-pipettával levegőt buborékoltatunk át. A csövek tartalmát ezután turmixoljuk, szobahőmérsékleten 15 percig inkubáljuk, majd ismét turmixoljuk. A DNS-elegyeket ezután cseppenként, pipettából adjuk a sejteket tartalmazó lemezre. Az elegyet a lemezeken ezután szétrázzuk, és a lemezeket 37 °C hőmérsékleten 4–6 órán át inkubáljuk. Inkubálást követően minden egyes lemezre 2 ml 20%-os, triszsóoldatban higított glicerint adunk (a triszsóoldat összetétele: 0,375 g KCl, 0,71 g Na_2HPO_4, 8,1 g NaCl, 3,0 g trisz-HCl, 0,5 g szacharóz, 1 literre hígítva, és pH 7,9-re állítva). A lemezeken az oldatot szétrázzuk, és a lemezeket szobahőmérsékleten 2 percig állni hagyjuk. Ezután a lemezekről a tápközeget eltávolítjuk, és 2 ml triszsóoldattal helyettesítjük. A lemezeket szobahőmérsékleten 2 percig állni hagyjuk, majd a triszsóoldatot eltávolítjuk, és 10 ml nem szelektív tápközeggel helyettesítjük. Ezután a lemezeket 37 °C hőmérsékleten 2 napig inkubáljuk.

1. táblázat

Transzfekció*

	544	545	544 kontroll	545 kontroll
Plazmid neve				
544 klón	15 μl	–	15 μl	–
545 klón	–	30 μl	–	30 μl
p486	1,5 μl	1,5 μl	–	–
Hordozó-DNS	1,6 μl	1,6 μl	1,6 μl	1,6 μl

Az alkalmazott DNS-koncentrációk: 544 klón: 0,7 μg/μl; 545 klón: 0,3 μg/μl; p486: 1,49 μg/μl

Kétnapos inkubálást követően a sejteket szelekciós tápközegben hígítjuk (a szelekciós tápközeg DMEM, amely 10% dializált magzati borjúszérumot, 1% PSN-antibiotikum elegyet és 150 nmol/l metotrexátot tartalmaz), és maxilemezeken 1:100, 1:250 és 1:500-szoros hígításokban szélesztjük. A szélesztett lemezeket 37 °C hőmérsékleten 1 hétig inkubáljuk. 1 hét elteltével a tápközeget kicseréljük, szelekciós tápközeggel helyettesítjük, és a lemezeken ellenőrizzük a telepképződést.

8 nap múlva, a telepképződést követően, 12 telepet véletlenszerűen kiválasztunk az #544 és #545 transzfekciós lemezek 1:500-szoros hígítású lemezeiről. 6-lyukú lemez minden egyes lyukába 1 klónt viszünk, és szelekciós tápközegben tenyésztjük. 7 nap múlva a lemezeken a tenyészet összenő, és a klónok mindegyikét 10 cm-es lemezekre hasítjuk szelekciós tápközegben.

Az előzőekben leírt klónokat és vad típusú VII faktor expresszálására transzfektált kontrollsejteket metabolikusan jelzünk 35_S-metionin-cisztein proteinjelző eleggyel (NFN DuPont Biotechnology Systems, Wilmington, DE). A klónokat tenyésztjük, és szelektív tápközegben előkészítjük izotópos jelzési vizsgálatra. A sejteket foszfáttal pufferolt sóoldattal öblítjük (Sigma, St. Louis, MO), és 20 μCi/ml-es ^{35}S-Cys-^{35}S-Met-nal 4 órán át kezeljük. A 4 óra elteltével a felülúszókat és a sejteket gyűjtjük. A sejteket lényegében a Lenk és Penman [Cell *16*: 289–302 (1979)] által leírt módon

lizáljuk, és minden egyes lizátumból 400 µl-t 50 µl staph A-val (Sigma, St. Louis, MO) előkezelünk.

A metabolikusan jelzett sejtekből vett mintákat radioimmunprecipitációnak (RIP) tesszük ki oly módon, hogy a mintákat először 6 µl anti VII faktor poliklonális antiszérummal inkubáljuk 4 órán át. Minden egyes mintához 60 µl mosott staphylococcus A proteint adunk, és a mintákat 1,5 órán át 4 °C hőmérsékleten rázatjuk. A mintákat ezután centrifugáljuk, a felülúszót eltávolítjuk. Az üledéket 0,7 mol/l-es RIPA puferrel (10 mmol/trisz, pH 7,4, 1% dezoxikólsav [Calbiocem Corp., La Jolla, CA], 1% Triton X–100, 0,1% SDS, 5 mmol/l EDTA, 0,7 mol/l NaCl) kétszer mossuk, majd 0,15 mol/l-es RIPA pufferrel (10 mmol/l-es trisz, pH 7,4, 1% dezoxikólsav (Calbiochem. Corp., La Jolla, CA), 1% Triton X–100, 0,1% SDS, 5 mmol/l EDTA, 0,15 mol/l NaCl) egyszer mossuk. Minden egyes mintához hozzáadunk 0,01 µl 1x SDS színezéket (50 mmol/l trisz-hidrogén-klorid, pH 6,8, 100 mmol/l ditiotreitol, 2% nátrium-dodecil-szulfát [SDS], 0,1% brómfenolkék, 10% glicerin), és a mintákat 5 percig forraljuk, majd centrifugálással eltávolítjuk belőlük az A proteint. Minden mintából 50 µl mennyiséget 10%-os poliakrilamidgélen futtatunk. Az eredmények azt mutatják, hogy a tíz kiválasztott klónból kilenc tartalmazza a módosított VII faktort.

II. példa

A módosított VII faktor antikoagulánsaktivitása

A módosított VII faktor proteinkicsapódást gátló képességét egy egylépéses kicsapási vizsgálatban mérjük, kontrollként vad típusú VII faktor alkalmazásával. Rekombináns proteineket készítünk lényegében az előzőekben leírt módon 5 µg/ml K-vitamint tartalmazó tápközegben tenyésztett sejtekből. A módosított VII faktor (az 544 számú klónból) vagy a rekombináns vad típusú VII faktor különböző mennyiségeit 50 mmol/l-es, pH 7,5-ös, 0,1 BSA tartalmú pufferben 100 µl-re hígítjuk. Az elegyeket 100 µl VII faktor hiányos plazmával (George King Bio-Medical Inc., Overland Park, KS) és 200 µl tromboplasztin C-vel (Dade, Miami, FL; nyúlagy-tromboplasztint és 11,8 mmol/l Ca^{++}-t tartalmaz) inkubáljuk. Az alvadási vizsgálatot automata koagulációsidő-mérő berendezésben (MLA Electra 800, Medical Laboratory Automation Inc., Pleasantville, NY) határozzuk meg, és az alvadási időket VII faktor aktivitás egységekké alakítjuk olyan standard görbe alkalmazásával, amelyet normál gyűjtött humán plazma (amely feltételezés szerint egy egység/ml VII faktor aktivitással bír; és amelyet egészséges donorok citráttal kezelt gyűjtött szérumából készítünk) 1:50 és 1:640 közötti hígításaiból veszünk fel. Ezzel a vizsgálattal meghatározva a módosított VII faktor kimutatható koagulánsaktivitással nem bír. A 2. táblázatban a vizsgálat eredményeit mutatjuk be az alvadási időket a kontrollra (nem transzfektált), BHK sejtekkel kondicionált tápközeg, (+/– K-vitamin) vad típusú VII faktorra és két, a módosított VII faktort kifejező sejtizolátumra adjuk meg. A VII faktor aktivitás a kontrollmintákhoz viszonyított alvadásiidő-csökkenésben jelenik meg.

2. táblázat

Minta	Hígítás	Alvadási idő
Kontroll +K	1:5	33,1
	1:10	33,4
Kontroll –K	1:5	34,3
	1:10	33,2
Vad típusú VII faktor	1:20	19,0
	1:40	21,5
	1:80	23,3
Módosított VII faktor (#6),	1:1	33,5
Módosított VII faktor (#10),	1:1	32,5

A módosított VII faktor plazmafaktor szubsztrátra gyakorolt hatásának meghatározására módosított VII faktor és rekombináns vad típusú vagy natív VII faktor készítményeket inkubálunk X faktorral vagy IX faktorral, és az aktiválódást az alvadási vizsgálattal vagy poliakrilamidgél-elektroforézissel követjük nyomon.

III. példa

A módosított VII faktor szövetfaktorkötő képessége

A módosított VII faktornak vad típusú VII faktorral a szövetfaktorért való versengési képességét és alvasztóaktivitásának gátlását egylépéses alvadási vizsgálatban határozzuk meg korlátozott mennyiségű szövetfaktor (tromboplasztin) jelenlétében.

Az alvadási időket egy egylépéses vizsgálatban határozzuk meg a II. példában leírthoz hasonló módon. A vizsgálatokban korlátozott mennyiségű szövetfaktort, konstans mennyiségű vad típusú VII faktort és növekvő mennyiségű variáns VII faktort alkalmazunk. A VII/VIIa faktor prokoagulánsaktivitás-gátlása a vizsgálat során a növekvő mennyiségű variáns VII faktor alkalmazásakor megjelenő növekvő alvadási időben jelentkezik.

A vizsgálati minták VII faktor aktivitás mennyiségét a normál gyűjtött plazmában mért VII faktor standard görbéjének százalékos értékében adjuk meg. A VII faktor aktivitás standard görbét úgy hozzuk létre, hogy sorozathígításokat készítünk foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS) normál gyűjtött plazmából, a hígítás 1:5 és 1:640 közötti. Az ilyen célú felhasználásnál feltételezzük, hogy a normál plazma mintegy 500 ng/ml VII faktort tartalmaz, és ezt tekintjük egy aktivitásegységnek. Az alvadási időt MLA Electra 800 automatikus alvadásiidő-mérő berendezésen határozzuk meg 100 µl VII faktorhiányos plazma, 100 µl hígított plazma és 200 µl tromboplasztin-C (Dade, Miami, FL.) elegyének alkalmazásával. A standard görbe meghatározására az eredményeket grafikusan ábrázoljuk, az aktivitás százalékos értékét (1:5=100% aktivitás) a szekundumokban megadott alvadási idő függvényében ábrázolva.

A vizsgálathoz az szükséges, hogy a vad típusú és a variáns VII faktort tartalmazó tápközeg kevesebb mint 1% szérumot tartalmazzon. A hígításokat foszfáttal pufferolt sóoldatban készítjük úgy, hogy az alvadási idő a standard görbe mentére essen. Jellemző a minimális 1:2 arányú hígítás. A végtérfogat 100 µl. A vizsgála-

tokban két különböző humán VII faktor Ser_{344} -> Ala variánst vizsgáltunk, ezek jelölése „#10" és „#6". Az eredményeket az alábbi, 3. táblázatban mutatjuk be, az eredményekből az látható, hogy a variáns VII faktor mennyiségének növekedésével a VIIa faktor aktivitás csökken.

3. táblázat

Ser_{344} -> Ala variánssal végzett elegyítési vizsgálat eredménye [B4A1 (vad típusú) tápközeg alkalmazásával 100%-os aktivitásként, 10 µl reakcióelegy]

% Ser_{344} -> Ala klón-szám	Variáns közepes mennyiség	B4A1 közepes mennyiség	BHK kontroll*	VIIa faktor aktivitás
#10	10 µl	10 µl	0	70
#10	20 µl	10 µl	0	51
#10	30 µl	10 µl	0	43
#10	40 µl	10 µl	0	34
#10	50 µl	10 µl	0	28
#10 (–K)§	20 µl	10 µl	0	78
#6	10 µl	10 µl	0	74
#6	20 µl	10 µl	0	56
#6	30 µl	10 µl	0	46
#6	40 µl	10 µl	0	41
#6	50 µl	10 µl	0	32
#6 (–K)§	20 µl	10 µl	0	85
BHK kontroll	0	10 µl	20 µl	91
BHK kontroll (–K)	0	10 µl	20 µl	107

* Nem transzfektált kondicionált tápközeg

§ A variáns VII faktor expresszálására a sejteket K-vitamin jelenlétében tenyésztjük, kivéve ahol „(–K)" jelölés szerepel

Az előbbi vizsgálatok azt mutatják, hogy az olyan VII faktor variánsok, amelyekben Ser_{344} –> Ala helyettesítés fordul elő, a natív VII faktorral dózisfüggő módon versengenek, és a natív VII/VIIa faktor prokoagulánsaktivitását gátolják. Megállapíthatjuk, hogy a humán VII faktor Ser_{344} –> Ala variáns a natív humán VIIa faktorral verseng, ennek következtében gátolja a X és/vagy IX faktor humán plazmában bekövetkező aktiválását.

IV. példa

VII faktor reakciója PPACR-kal

Rekombináns VII faktort hozunk létre transzfektált bébihörcsögvese-sejtekben. A proteineket Thim és munkatársai [Biochemistry, *27*, 7785–7793 (1988); Brinkous és munkatársai, [Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*: 1382–1386 (1989)] és Bjoern és Thim [Res. Discl. No 269, 564 (1986)] által leírt módon tisztítjuk és aktiváljuk, a fenti irodalmi hivatkozásokat leírásunkba referenciaként építjük be. A sejttenyésztő közeget kinyerjük, szűrjük, és a sókoncentráció csökkentésére hígítjuk. A hígított tápközeget anioncserélő kromatográfiával frakcionáljuk, eluáló pufferként kalcium-kloridot tartalmazó puffert alkalmazunk. A VII faktor frakciót kinyerjük, és immunkromatográfiás eljárással kalciumfüggő anti-VII faktor monoklonális antitest alkalmazásával tisztítjuk. További tisztítást végzünk két anioncserélő kromatográfiás lépéssel, amelyekben a VII faktort kalcium-klorid, illetve nátrium-klorid alkalmazásával eluáljuk. A VIIa faktort a végső eluátumban nyerjük.

Rekombináns VIIa faktort (1 mol/l), 100 mmol/l nátrium-kloridot és 5 mmol/l kalcium-kloridot tartalmazó, pH 7,4-es, 50 mmol/l-es trisz-hidrogén-klorid pufferben inkubálunk 20 µmol/l-es PPack-kal (dansil-fenilalanil-prolil-arginil-klór-metil-keton; Calbiochem, La Jolla, CA) 5, 20, illetve 60 percig. Ezután az elegyhez az S2288 kromogén szubsztrátot (H-D-izoleucin-L-prolil-L-arginin-p-nitroanilid; Kabi Vitrum AB, Molndal, Svédország) tartalmazó puffert adunk olyan mennyiségben, hogy 2,5-szeres hígítást és 0,3 mmol/l S2288 végkoncentrációt érjünk el. Mérjük a p-nitroanilin-képződést, és összehasonlítjuk a kontrollként alkalmazott kezeletlen VIIa faktor alkalmazásával kapott hasonló eredményekkel. Az eredmények azt mutatják, hogy a VIIa faktor a fenti reakciókörülmények mellett mintegy 60 perc után teljesen inaktiválódik.

V. példa

VII faktor reakciója DEGRcK-val

Rekombináns VIIa faktort készítünk a IV. példában leírt módon. A VIIa faktort (1 mol/l) 0,7 mmol/l DEGRcK-val (dansil-Glu-Gly-Arg klór-metil-keton; Calbiochem) inkubáljuk'37 °C hőmérsékleten 1 órán át, 200 µl össztérfogatú, 0,1 mol/l nátrium-kloridot, 0,5% BSA-t és 0,05 mol/l trisz-hidrogén-kloridot tartalmazó pH 7,5-ös pufferben. Az inkubálást követően az elegyet éjszakán át 4 °C hőmérsékleten dializáljuk 0,1 mol/l nátrium-kloridot tartalmazó 0,05 mol/l-es, pH 7,5-ös trisz-hidrogén-klorid pufferral szemben.

A módosított VII faktor alvadási aktivitását örökletesen VII faktor hiányos plazma alvadási idejének változását nyomon követve határozzuk meg. 100 µl mintát egyesítünk 100-100 µl VII faktor hiányos plazmával, humánagy-tromboplasztinnal (amelyet Nawroth és munkatársai [Thromb. Res. *44*, 625–637 (1986)] által leírt módon állítunk elő) és 25 mmol/l-es kalcium-kloriddal. Az alvadási időket standard görbe alapján VII faktor aktivitás egységekké alakítjuk, a standard görbét normál gyűjtött humán plazma 1:5 és 1:200 közötti hígításai alapján hozzuk létre. Azt tapasztaljuk, hogy a VIIa faktornak DEGRcK-val történő inkubálása a VII faktor alvasztási aktivitásának teljes elvesztését okozza.

Az előzőekből nyilvánvaló, hogy olyan VII faktort vagy módosított katalitikus helyekkel bíró VII faktor kompozíciókat hozunk létre, amelyek képesek a szövetfaktorhoz való kötődésre, de lényegében képtelenek a X és IX faktorok aktiválására. Minthogy a módosított VII faktor sajátosan úgy hat, hogy megszakítja az alvadási kaszkádot anélkül, hogy az alvadási faktorokat lebonta-

ná vagy elfogyasztaná, várható, hogy a módosított VII faktor készítmények adagolása kevesebb nem kívánt mellékhatással bír, mint az a jelenleg hozzáférhető terápiáknál tapasztalható. Továbbá a találmány szerinti módosított VII faktor könnyen előállítható rekombináns eljárásokkal. Így a hatékonyság, az alacsonyabb dózisok kényelmes és gazdaságos adagolása, valamint a ritkább adagolás és a toxicitás relatív hiánya képezik többek között a találmány szerinti kompozíciók előnyeit.

Az előzőekben leírtak példaként szolgálnak a találmány bemutatására, érthetővé tételére, nyilvánvaló, hogy bizonyos módosítások és ettől való eltérések a találmány oltalmi körén belül esnek.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Gyógyászati készítmény, amely olyan VII faktor hatóanyagot tartalmaz, amely katalitikus centrumában legalább egy olyan módosítással bír, amely módosítás lényegében meggátolja, hogy a módosított VII faktor a plazma X vagy IX faktort aktiválja, és emellett fiziológiai szempontból elfogadható hordozóanyagot tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amelynek hatóanyagául szolgáló VII faktor egy szerinproteáz inhibitorral való reagáltatás révén módosított.

3. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amelynek hatóanyagául szolgáló VII faktor szerves foszforvegyülettel, szulfanil-fluoriddal, peptid-halogén-metil-ketonnal vagy egy azapeptiddel való reagáltatás révén módosított.

4. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amelynek hatóanyagául szolgáló VII faktor Phe-Pro-Arg-klór-metil-keton vagy dansil-Glu-Gly-Arg-klór-metil-keton peptid-halogén-metil-keton inhibitorral módosított.

5. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amelynek hatóanyagául szolgáló VII faktor módosítása a Ser, Asp és His katalitikus triád legalább egy aminosavjának helyettesítésével vagy ezen belül egy aminosav inszerciójával vagy kiiktatásával végrehajtott.

6. Az 5. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amelynek hatóanyagául szolgáló VII faktor a Ser_{344} egység helyettesítése révén módosított.

7. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amelyben a módosított VII faktor humán eredetű.

8. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amely fiziológiai szempontból elfogadható hordozóanyaggal kombinálva katalitikus centrumában legalább egy olyan módosítást tartalmazó humán VII faktort tartalmaz, amely módosítás lényegében gátolja az így módosított VII faktor plazma X vagy IX faktort aktiváló képességét, és amely módosítás a humán VII faktor egy peptid-klór-metil-ketonnal való reagáltatásának eredménye.

9. VII faktor, amely legalább egy aminosavmódosítást tartalmaz a Ser, Asp és His katalitikus triádon belül, amely módosítás lényegében meggátolja, hogy a Vlla faktor a plazma X vagy IX faktort aktiválja.

10. A 9. igénypont szerinti módosított VII faktor, amelynek katalitikus triádja Ser_{344}, Asp_{242} és HIS_{193}.

11. A 10. igénypont szerinti módosított VII faktor, amelyben az aminosavmódosítás egy helyettesítésben áll.

12. A 11. igénypont szerinti módosított VII faktor, amelyben a helyettesítés a Ser_{344} egységen történik.

13. A 12. igénypont szerinti módosított VII faktor, amelyben az Ala, Gly, Met vagy Thr valamelyike áll a Ser_{344} helyén.

14. A 11. igénypont szerinti módosított VII faktor, amelyben a His_{193} helyén Lys vagy Arg áll.

15. A 9. igénypont szerinti módosított VII faktor, amely humán eredetű.

16. A 9. igénypont szerinti módosított VII faktor, amely marha eredetű.

17. A 9. igénypont szerinti módosított VII faktor, amely lényegében tiszta.

18. A 9. igénypont szerinti módosított VII faktor, amely aktiválási helyén hasított.

19. A 9. igénypont szerinti módosított VII faktor, amely a vad típusú Vlla faktorral a szövetfaktor megkötéséért verseng.

20. Polinukleotid molekula, amely két operatívan kötött szekvenciát kódoló régiót tartalmaz, amelyek egy K-vitamin-függő plazmaprotein egy prepropeptidjét és egy gla domenjét, valamint egy olyan gla domén-mentes VII faktort kódolnak, amely a Ser, Asp és His katalitikus triádjában legalább egy aminosavmódosítással bír, és ahol az említett polinukleotid expresszió-ja révén egy olyan módosított VII faktor molekulát kódol, amelynek plazma X vagy IX faktor aktiváló képessége lényegesen csökkent.

21. A 20. igénypont szerinti polinukleotid molekula, amelyben az aminosavmódosítás a Ser_{344}, Asp_{242} és His_{193} katalitikus triádban következik be.

22. A 20. igénypont szerinti polineukleotid molekulával transzfektált emlőssejt.

23. A 21. igénypont szerinti polinukleotid molekulával transzfektált emlőssejt, amelyben a Ser_{344}, Asp_{242} és His_{193} katalitikus triád humán VII faktorból származó.

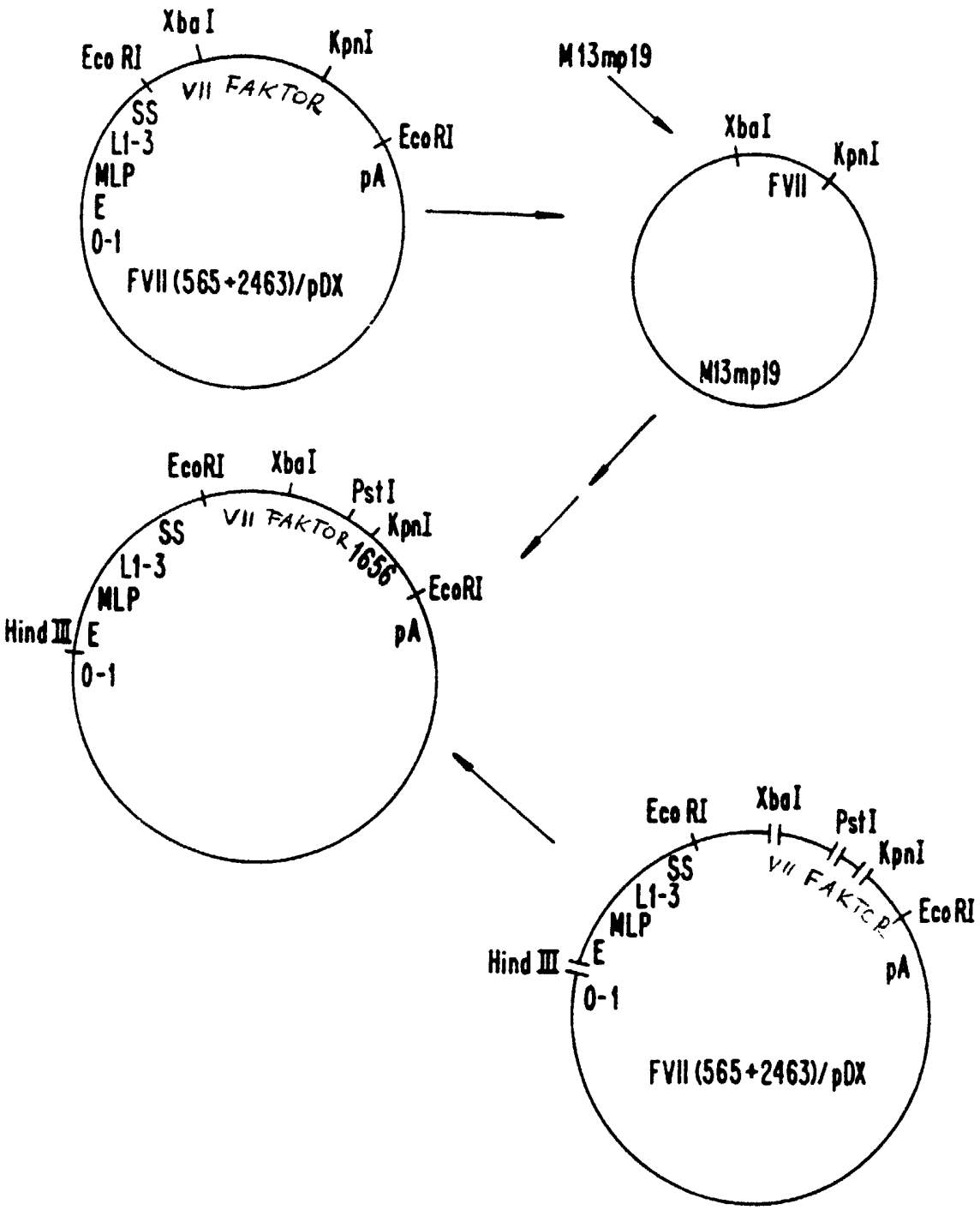
24. Eljárás gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve,* hogy VII faktor katalitikus centrumában olyan módosítást hajtunk végre, amely lényegében gátolja az így módosított VII faktor plazma X vagy IX faktort aktiváló képességét, és a módosított VII faktort, és a fiziológiás szempontból elfogadható hordozóanyagot gyógyászati készítménnyé formáljuk.

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy humán VII faktort alkalmazunk, és azt szerinproteáz-inhibitorral reagáltatva módosítjuk.

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy szerin-proteáz-inhibitorként szerves foszforvegyületet, szulfanil-fluoridot, peptid-halogén-metil-ketont vagy azapeptidet alkalmazunk.

27. A 25. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy peptid-klór-metil-ketont alkalmazunk.

28. A 24. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy humán VII faktort alkalmazunk, és azt a Ser, Asp és His katalitikus triád legalább egy aminosavjának helyettesítésével, inszerciójával vagy kiiktatásával módosítjuk.



Kiadja a Magyar Szabadalmi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Törőcsik Zsuzsanna főosztályvezető-helyettes
Windor Bt., Budapest