



**Expressziós rendszer a VIII. faktor
expresszálására**

K I V O N A T

A találmány tárgyát VIII. faktorének megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérjék előállítására szolgáló, proteinentes eljárás képezi, továbbá a fehérjéket expresszáló emberi lymphoma sejtekből és 293S sejtekből származó emberi sejt vonal. Általánosságban, az eljárás során olyan, stabilis, emberi sejtklónokat állítanak elő, amelyek a B-doméntól megfosztott VIII. faktort nagy mennyiségben termelik, és (2) a sejteket alkalmassá teszik arra, hogy plazmaeredetű proteinektől mentes tápoldatban szaporodjanak. Konkrétabban, az eljárásban az emberi sejteket - szelektálható markert és a VIII. faktorének megfelelő prokoaguláns aktivitású proteint kódoló szekvenciát tartalmazó - vektorral (mint amilyen a mellékelt ábrán látható) transzfektálják, a sejteket szelektáló hatóanyaggal szelektálják, és izolálják a VIII. faktorének megfelelő prokoaguláns aktivitású proteineket nagy mennyiségben expresszáló klónokat.

*jellemző a B. ábrán
leírta*



Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

**Expressziós rendszer a VIII. faktor
expresszálására**

A találmány tárgya tökéletesített eljárás a VIII. faktor és származékainak előállítására. Általánosságban, az eljárás vektor-előállításból, transzfelektióból, és proteintől mentes körülmények között, fokozott termelékenységre képes sejtvonalak szelekciójából áll. A találmány tárgyát előnyösen a VIII. faktorénak megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérjék ipari méreteken történő előállítására szolgáló eljárás képezi.

Az emberi VIII. faktor a plazmában nyomokban jelen lévő glikoprotein, amely kofaktorként résztvesz a X. faktor és a IXa. faktor aktiválásában. A VIII. faktor öröklött hiánya a X. faktorhoz kötött "hemofília A" típusú vérzékenységet okozza, amelyet azonban eredményesen lehet kezelni tisztított VIII. faktoral. A "hemofília A" ún. pótlásos terápiája a plazmából kivont VIII. faktor alkalmazásától - a VIII. faktort kódoló cDNS, emlősejteken történt



klónozásával és expresszálasával nyert - rekombináns VIII. faktor alkalmazásáig fejlődött [Wood és mtsai., *Nature* 312, 330 (1984)].

Az A1-A2-B-A3-C1-C2 doménszerveződésű VIII. faktor 2351 aminosavból álló, egyetlen láncból álló polipeptidként szintetizálódik. Ebből a polipeptidláncból az endoplazmatikus retikulum üregébe történő transzlokáció során egy 19 aminosavból álló szignálpeptid hasad le. Miután a VIII. faktor erősen glikozilált, ezért igen nehéz e faktor nagy mennyiségű (>0,2 pg/sejt/nap) expresszióját elérni [Lind és mtsai., *Eur. J. Biochem.* 232, 19-27 (1995); Kaufman és mtsai., *Mol. Cell. Biol.* 9, 1233-1242 (1989)]. A VIII. faktor emlőssejtekben történő expressziója - más gének hasonló vektorokkal és eljárásokkal végzett expressziója során megfigyeltekhez viszonyítva - jellemzően 2-3 nagyságrenddel alacsonyabb. A VIII. faktort termelő sejtek termelékenységé a 0,5-1 μ U/sejt/nap (0,1-0,2 pg/sejt/nap) tartományon belül van.

Kimutatták, hogy a prokoagulációs aktivitás szemontjából a VIII. faktor B-doménje szükségtelen. Számos kutatócsoport kimutatta, hogy emlőssejtekben a VIII. faktor expresszióját növelni lehet a VIII. faktor csonkolt változatainak alkalmazásával [Lind és mtsai., *Eur. J. Biochem.* 232, 19-27 (1995); Tajima és mtsai., *Proc. 6th Int. Symp. H. T.*, 51-63 (1990); Almstedt, 5.661.008 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat (1997)]. Azonban, stabilis sejtklónokban a VIII. faktor változatainak expressziós szintje még így is 1 pg/sejt/nap szint alatt maradt.



Az alábbiakban összefoglaljuk a találmány szerinti megoldást. Megalkottunk egy eljárást, amely a VIII. faktorénak megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérjéket rendkívül nagy mennyiségben termelő sejteket eredményez, illetve (ii) egy plazmaproteinektől mentes eljárást a VIII. faktorénak megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérjék előállítására.

A VIII. faktorénak megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérjék előállítására szolgáló eljárás ipari léptékű is lehet. Újonnan létrehozott gazdasejt alkalmazásával olyan sejtklónokat állítottunk elő, amelyek specifikus termelékenységi tartománya 2-4 pg/sejt/nap (10-20 μ U/sejt/nap) közötti. Szérumtól mentes körülmények között, egy klón elérte a 2-4 pg/sejt/nap termelékenységet. Egy 15-literes perfúziós fermentorban az ilyen magas termelékenységi szintű klónok képesek naponta 3-4 millió egység proteint termelni. Definíció szerint, egy milliliter plazmában VIII. faktor aktivitása egy egységnyi. Általában, 1 pg VIII. faktor körülbelül 5 μ U VIII. faktor aktivitással egyenlő.

A leírás szerinti értelemben, VIII. faktorénak megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérje az a fehérje, amely a X. faktor aktiválását okozza *in vitro* vagy *in vivo* modellrendszerben. Ez a meghatározás vonatkozik - példaképpen - a teljes hosszúságú, rekombináns, emberi VIII. faktorra és a B-doméntól megfosztott VIII. faktorra, amelynek szekvenciáját az 1. ábra tartalmazza.



Amennyiben a sejteket plazmaeredetű proteinektól mentes médiumban tenyésztjük a VIII. faktorénak megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérje magas szintű expressziója legalább 2 $\mu\text{U}/\text{sejt}/\text{nap}$ mennyiségű, vagy előnyösebben 4 $\mu\text{U}/\text{sejt}/\text{nap}$ mennyiségű, vagy legelőnyösebben körülbelül 5 $\mu\text{U}/\text{sejt}/\text{nap}$ mennyiségű VIII. faktor aktivitást jelent, míg plazmaeredetű fehérjével kiegészített tápoldat esetén legalább 4 $\mu\text{U}/\text{sejt}/\text{nap}$ mennyiségű, vagy előnyösebben legalább körülbelül 8 $\mu\text{U}/\text{sejt}/\text{nap}$ mennyiségű, vagy legelőnyösebben körülbelül 10 $\mu\text{U}/\text{sejt}/\text{nap}$ mennyiségű VIII. faktor aktivitást jelent. Amennyiben az expresszált protein BDD-FVIII, a specifikus termelékenységű sejtek esetében körülbelül 15 $\mu\text{U}/\text{sejt}/\text{nap}$, vagy előnyösebben körülbelül 20 $\mu\text{U}/\text{sejt}/\text{nap}$ mennyiségű VIII. faktor aktivitás nyerhető az itt leírt eljárás alkalmazásával.

A leírás szerinti értelemben a sejtvonalak eredete, azaz "származása" - többek között - normális mitotikus sejtosztódást és valamilyen folyamatot, mint például transzfekeciót, sejtfüziót, vagy más - a sejtek megváltoztatására vagy új tulajdonságokkal rendelkező sejtek előállítására alkalmazott - génszűrés eljárást jelent.

Az alábbiakban röviden leírjuk a leíráshoz tartozó ábrákat.

1. ábra: A BDD-FVIII aminosav-szekvenciája (a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia).



2. ábra: Az Epstein-Barr vírusból izolált terminális ismétlődő szekvencia (TR) szekvenciája (a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia).

3. ábra: A pCIS25DTR plazmid térképe.

4(a). ábra: A 20B8 klón eredete.

4(b). ábra: különböző tápoldatokban tenyésztett klónok termelékenységének összehasonlítása. Minden egyes klónnal végzett két hónapos stabilitási teszt során kapott adatokat három-három adatpontban ábrázoltuk.

5. ábra: A 20B8 klón termelékenysége térfogatban.

Az alábbiakban bemutatjuk a találmány egyes konkrét megvalósítási módjait.

FVIII vizsgálat

Metotrexátra (MTX) rezisztens sejtpopulációkban, rekombináns gének expressziójával nyert VIII. faktorszárma-zékok aktivitását kromogén szűrővizsgálattal mértük. Az aktivitás mennyiségi meghatározását *Coatest® factor VIII:C/4* készlettel (Chromogenix, Molndal, Svédország) alkalmazásával végeztük a gyártó rendelkezései szerint. Ebben a szűrővizsgálatban, mérési standardként a MEGA 1 néven ismert (Office of Biologic Research and Review, Bethesda, MD) U.S. standard hemofília elleni faktort (VIII. faktor) alkalmaztuk [Barrowcliffe, *Thromb. Haem.* 70, 876 (1993)].



B-doméntól megfosztott FVIII expressziójára szolgáló vektorok előállítása

A B-doméntól megfosztott (BDD) FVIII szekvenciáját az 1. ábrán mutatjuk be. A 90 kD és 80 kD láncokat egy 14 aminosavból álló linkerrel kapcsoltuk össze [lásd: Chan, S.-Y., "Production of recombinant factor VIII in the presence of liposome-like substances of mixed composition", 08/634,001 sz. amerikai bejelentés, 1996. április 16]. A BDD-FVIII expresszálására szolgáló vektort standard rekombináns-DNS eljárások alkalmazásával készítettük. Az expressziós vektor (pCIS25DTR) felépítését a 3. ábrán mutatjuk be. A vektor tartalmaz a BDD-FVIII transzkripciójára szolgáló egységet és dihidrofolát-reduktáz (*dhfr*) szelektálható markert. Ezenfelül, a vektorba Epstein-Barr vírusból származó terminális ismétlődő szekvenciát (2. ábra) - amelyről egyébként kimutatták, hogy fokozza a szelektáló hatóanyag szelektivitását - illesztettünk a beépülés hatékonyságának növelésére. A vektor - lényegét tekintve - olyan vektorkonstrukció (ATCC 98879 sz. letétbe helyezve), amelyet az 1. ábrán bemutatott szekvenciának megfelelő transzkripcionális egység befogadására készítettünk. A terminális ismétlődő szekvenciával kapcsolatos további információk a rokon szabadalmi bejelentésben [Cho és Chan MSB-7254 számon jelölt bejelentése (09/209,915 sz. amerikai bejelentés), "Vectors having terminal repeat sequence of Epstein-Barr virus", amelyet a jelen bejelentéssel egyidőben nyújtottunk be] található, amely bejelentés a kitanítás részét képezi.



Hasonló, a VIII. faktorénak megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérjéket expresszáló sejtek létrehozására alkalmas vektorokat a szakember elő tud állítani és képes alkalmazni. Például, a BDD-FVIII-at kódoló szekvenciát helyettesíteni lehet VIII. faktor, prokoaguláns aktivitását megtartó, ismert variánsait kódoló szekvenciákkal. Ezenkívül, a *dhfr* helyett más, szelektálható markert (például glutaminszintetáz-gént (*gs*) vagy multidrug-rezisztenciagént (*mdr*)) is lehet alkalmazni. A szelekciós hatóanyagot - szakember számára nyilvánvaló módon - az alkalmazott génnek megfelelően kell kiválasztani, azaz például a *dhfr*-hez az előnyös szelekciós hatóanyag a metotrexát, a *gs*-hez az előnyös szelekciós hatóanyag a metionin-szulfoximin, és az *mdr*-hez pedig az előnyös szelekciós hatóanyag a kolhicin.

Példák

BDD-FVIII-at expresszáló sejtvonalak előállítására:
transzfekeció, szelekció és génamplifikáció

Elektroporációval 30 µg pCIS25DTR DNS-t HKB11 sejtekbe (ATCC katalógusszám: CRL 12568 - 293S sejtek és emberi Burkitt-féle lymphoma sejtek hibridje, lásd: Cho által, a jelen bejelentéssel egyidőben benyújtott, MSB-7241 sz. szabadalmi bejelentés, amely bejelentés a kitanítás részét képezi) juttatunk be 300 V és 300 µF mellett (BTX Electro cell manipulator 600) 2 mm-es kúvetta (BTX #620 alkatrész). A HKB11 sejtekkel párhuzamosan végzett összehasonlító kísérletekben CHO (chinese hamster ovary, aranyhórcsög ovárium) sejteket és 193S (human embryonic kidney, emberi emb-



rióvese) sejteket transzfektáltunk DMRIE-C kationos lipidreagens (Life Technologies, Gaithersburg, MD), a Life Technologies által biztosított protokoll szerinti, alkalmazásával. A transzfektált sejtek felszaporítását növekvő metotrexát (MTX) koncentráció (100 nM, 200 nM, 400 nM, és 800 nM) mellett, $1 \cdot 10^6$ sejt/96 lyukú lemez alkalmazásával hipoxantintól és timidintől mentes MTX-szelekciós tápoldatban (hipoxantintól és timidintől mentes DME/F12 tápoldat + 5% dializált borjúsérum (Hyclone, Logan, UT)) végeztük. A szaporodásra képes, MTX-rezisztens sejteket kiválogattuk, és a transzfekciót követő 2-3 hét múlva Coatest® factor VIII reagenskészlettel BDD-FVIII szekretálására nézve szkríneltük. A sejteket 37°C-on, párásított, 5%-os CO₂-t tartalmazó termosztátban tenyésztettük.

Limitált hígításiós klónozás

Magas termelékenységű sejtpopulációkból egyedi sejtklónokat (SCC) állítottunk elő limitált hígításiós klónozással (LDC) 96 lyukú lemezekben, sérumentes körülmények között. Lyukanként 1-10 sejtet helyeztünk el 10 µg/ml mennyiségű Humulin® elnevezésű rekombináns inzulint (Lilly, Indianapolis, IN), 10x esszenciális aminosavakat (Life Technology, Gaithersburg, MD), és Plasmanate® elnevezésű, emberi plazmaprotein-frakciót (Bayer, Clayton, NC) tartalmazó DME/F12 tápoldatba. A Plasmanate® elnevezésű, emberi plazmaprotein (HPP) frakció emberi albumint (88%) és különféle globulinokat (12%) tartalmaz. A klónokat Coatest® factor VIII reagenskészlettel szkríneltük BDD-FVIII termelékenységre nézve. A legjobban termelő klónokat rázatott



kultúrában, stabilitás szempontjából szelektáltuk. A HKB sejtek esetében, az első körben az LDC-t 5% dializált FBS-t tartalmazó szelekciós tápoldatban végeztük, míg a második körben szérummentes, de Plasmanate® HPP-frakciót tartalmazó tápoldatot alkalmaztunk adaptálva ezzel az első körben kiválasztott SCC-t a Plasmanate® HPP-frakcióval kiegészített szérummentes tápoldathoz.

A 20B8 HKB klón előállítás

Ahogy a 4(a). ábrán összefoglaltuk, pCIS25DTR plazmával transzfektált HKB sejtekből, 400 nM MTX-et, és 5% FBS-t tartalmazó szelekciós médiumban végzett felszaporítás után, 1C10 kiindulási populációt állítottunk elő. Az első egyedülálló sejtklónok (SCC-k) egyikét, az 1C10-ből 5% FBS-sel kiegészített szelekciós médiumban végzett LDC-vel előállított 10A8-at adaptáltuk Plasmanate® HPP-frakcióval kiegészített szérummentes tápoldathoz. Ebben a stádiumban, váratlanul, a 10A8 rendkívüli módon megnövekedett rFVIII termelést mutatott (4b. ábra). Ezért, Plasmanate® HPP-frakcióval kiegészített szérummentes tápoldat alkalmazásával egy második LDC-t végeztünk. A második LDC-ből származó SCC-k (pl. 20B8) termelékenysége hasonló volt a Plasmanate® HPP-frakcióhoz adaptált 10A8-éval. Az eredeti, szérumot tartalmazó tápoldattal végzett első LDC során előállított, 10A8 esetében kapottnál magasabb BDD-FVIII szintet mértünk a 20B8-cal végzett mérésben. Végül, a 20B8-at adaptáltuk plazmaeredetű proteinektől mentes (PPF) tápoldatban való szaporodáshoz. 20B8 mintákat letétbe helyeztünk az *American*



Type Culture Collection-be (Manassas, VA) (ATCC katalógus-szám: CRL-12582).

Ahogy az 1. táblázatban bemutattuk, HKB klónok kiemelkedő BDD-FVIII termelékenységet mutatnak. Transzfektált CHO és 293S sejtekből származó klónokkal összehasonlítva a HKB sejtek esetében 10-20-szoros növekedést figyeltünk meg a termelékenységben. Miután a szuszpenziós kultúrában való tenyésztés során a HKB sejtek nagy sejtaggregátumokat nem formálnak, ezért előnyösek a VIII. faktorénak megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérjék expresszáására.

1. táblázat

FVIII és BDD-FVIII expresszáása emberi és rágcsálóeredetű sejtvonalakban

	Specifikus termelékenység (μ U/sejt/nap) *			
	BHK	293s	CHO	HKB
FVIII származékok				
teljes hosszúságú FVIII	0,45	1,2	0,5	1,0
BDD-FVIII	ND	2,5	1,0	20

* Öt magas termelékenységű klón átlaga (szérummentes tápoldatban)

ND = nem végeztük el



A klónok adaptálása plazmaeredetű proteinektől mentes körülményekhez

Szérummentes szuszpenziós kultúrában való szaporodásra adaptált HKB klónokat hozzászoktattuk a plazmaeredetű proteinektől mentes körülményekhez. A szoktatás steril, polikarbonátból készült, rázatott kultúrák céljaira gyártott flaskákban (Corning, Corning, NY) történt $0,5 \cdot 10^6$ sejt/ml sejtsűrűség mellett plazmaeredetű proteinektől mentes tápoldat alkalmazásával. A plazmaeredetű proteinektől mentes (PPF) tápoldat - pluronic F68-at (0,1%), CuSO_4 -ot (50 nM), és $\text{FeSO}_4/\text{EDTA}$ -t (5 μM) tartalmazó - DME/F12 tápoldat volt. Teljes tápoldatcserét végeztünk minden 48 órában és a rázatott flaskákat újra beoltottuk $0,5 \cdot 10^6$ sejt/ml mennyiségű sejttel.

A 20B8 klón fermentációja

Tizenöt-literes perfúziós fermentorban megvizsgáltuk a 20B8 klón termelékenységét. A fermentorban a 20B8 klón sejtjeinek kezdeti sűrűsége $3 \cdot 10^6$ sejt/ml volt. A fermentorban a megelőző bekezdésben leírt, a termelésben alkalmazott szérummentes tápoldat átáramoltatásának mértéke 4 térfogat/nap volt. Az értékelési szakasz (45 nap) időtartama alatt fenntartott végső sejtsűrűség $2 \cdot 10^7$ sejt/ml volt. Ahogyan az 5. ábrán bemutattuk, a fermentáció első 4 hete alatt a termelésben alkalmazott, Plasmanate® HPP-frakcióval kiegészített, szérummentes tápoldattal átáramoltatott a 20B8 klón magas termelékenységűnek bizonyult. A 28. naptól a fermentációs vizsgálat befejezéséig a sejteket szérum- és Plasmanate® HPP-frakciótól mentes tápoldatban tartottuk.



Ahogy az 5. ábrán bemutattuk, a sejtek a plazmaeredetű proteinektől mentes környezetben az FVIII-at továbbra is nagy mennyiségben termelték. A leírás szerinti értelemben a "plazmaeredetű proteinektől mentes" kifejezés azt jelenti, hogy tápoldathoz lényegében semmilyen, plazmából izolált proteint sem adunk.

A HKB sejtekből való származtatással olyan, proteinmentes termelési rendszert állíthatunk fel, amely nemcsak BDD-FVIII, hanem más terápiás proteinek előállítására is alkalmas. A HKB sejtek alkalmazásával előállított proteinek emberi glikozilációs mintázatot mutatnak, amely lehetővé teszi bizonyos glikoproteinek *in vivo* féléletidejének megnövekedését. Ezek a sejtek adenovírus- és adenovíruseredetű, génterápiás célokra tervezett vírustörzsek előállítására is alkalmasak lehetnek.

A fenti példák a találmány szerinti megoldás bemutatására szolgálnak, és úgy véljük, hogy a szakember felismeri annak különböző változatait. Eszerint, a találmány ol-talmi körét az alábbi igénypontok határozzák meg.



SZEKVENCIALISTA

<210> 1

<211> 1438

<212> PRT

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: a humán VIII fak-
torból származó szekvencia

<400> 1

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



Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
385 390 395 400
Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
405 410 415
Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
420 425 430
Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
435 440 445
Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
450 455 460
Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
465 470 475 480
Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
485 490 495
His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
500 505 510
Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
515 520 525
Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
530 535 540
Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
545 550 555 560
Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
565 570 575
Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
580 585 590
Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
595 600 605
Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
610 615 620



Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr
865 870 875 880
Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile
885 890 895
Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe
900 905 910
Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His
915 920 925
Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe
930 935 940
Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro
945 950 955 960
Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln
965 970 975
Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr
980 985 990
Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro
995 1000 1005
Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe
1010 1015 1020
His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met
1025 1030 1035 1040
Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn
1045 1050 1055
Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg
1060 1065 1070
Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val
1075 1080 1085
Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val
1090 1095 1100



Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe
 1105 1110 1115 1120
 Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly
 1125 1130 1135
 His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp
 1140 1145 1150
 Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp
 1155 1160 1165
 Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro
 1170 1175 1180
 Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser
 1185 1190 1195 1200
 Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys
 1205 1210 1215
 Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe
 1220 1225 1230
 Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro
 1235 1240 1245
 Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile
 1250 1255 1260
 Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys
 1265 1270 1275 1280
 Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile
 1285 1290 1295
 Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser
 1300 1305 1310
 Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln
 1315 1320 1325
 Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met
 1330 1335 1340



Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser
 1345 1350 1355 1360
 Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln
 1365 1370 1375
 Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn
 1380 1385 1390
 Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu
 1395 1400 1405
 Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala
 1410 1415 1420
 Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 1425 1430 1435

<210> 2

<211> 402

<212> DNS

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: Epstein-Barr vírus-
ból származó szekvencia

<400> 2

ggcaatggag cgtgacgaag ggccccaggg ctgaccccg caaacgtgac ccggggctcc 60
 ggggtgaccc aggcaagcgt ggccaagggg cccgtgggtg acacaggcaa ccctgacaaa 120
 ggccccccag gaaagacccc cgggggggcat cgggggggtg ttggcgggtc atgggggggg 180
 cgggtcatgc cgcgcattcc tggaaaaagt ggagggggcg tggccttccc cccgcgcccc 240
 cctagcccc cgcgagagag cggcgcaacg gcgggcgagc ggcggggggt cgggggtccgc 300
 gggctccggg ggctgcgggc ggtggatggc ggctggcggt cgggggatcg ggggggggtc 360
 ggggggctgc gcgcggggcg agccatgcgt gaccgtgatg ag 402



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a VIII. faktorénak megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérjéket expresszáló, termelő sejtek előállítására azzal jellemezve, hogy:

a) kizárólag emberi eredetű sejteket alkalmazunk

b) az a) lépésben leírt sejteket - szelektálható markert és működőképesen promóterhez kapcsolt, a VIII. faktorénak megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérjét kódoló szekvenciát tartalmazó - vektorral érintkezésbe hozzuk olyan körülmények között, amelyek lehetővé teszik a vektornak a sejtekbe történő belépését,

c) a b) lépésből származó sejteket szelekciós hatóanyaggal szelektáljuk, és

d) a c) lépés során kapott sejtek közül a VIII. faktorénak megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérjét nagy mennyiségben expresszáló, egyedi klónokat izolálunk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy:

e) a d) lépés során kapott klónokat adaptáljuk a plazmaeredetű proteinektől mentes tápoldatban való szaporodáshoz.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az a) lépés sejtjeiként emberi lymphoma sejtek és 293S sejtek hibridjeit alkalmazzuk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az a) lépés sejtjeiként 2B8 sejtek (ATCC CRL-12569) és 293S sejtek hibridjeit alkalmazzuk.



5. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az a) lépés sejtjeiként HKB11 sejteket (ATCC CRL-12568) alkalmazunk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a c) és d) lépéseket egynél többször hajtjuk végre.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a b) lépésben említett szekvenciaként az 1. ábrán bemutatott (a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvenciát) kódoló szekvenciát tartalmazó vektorral hozzuk érintkezésbe a sejteket.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a b) lépés szerinti szekvenciaként az emberi VIII. faktort kódoló szekvenciát tartalmazó vektorral hozzuk érintkezésbe a sejteket.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a b) lépésben említett szelektálható markerként *dhfr*-t tartalmazó vektorral hozzuk érintkezésbe a sejteket és a c) lépésben, a szelektálásban alkalmazott hatóanyagként metotrexáttal szelektálunk.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a b) lépés szerinti szelektálható markerként *gs*-t tartalmazó vektorral hozzuk érintkezésbe a sejteket és a c) lépésben, a szelektálásban alkalmazott hatóanyagként metionin-szulfoximinnal szelektálunk.



11. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a b) lépésben említett szelektálható markerként *mdr*-t tartalmazó vektorral hozzuk érintkezésbe a sejteket és a c) lépésben, a szelektálásban alkalmazott hatóanyagként kolhicinnal szelektálunk.

12. Eljárás a VIII. faktorének megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérjék előállítására azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont szerinti eljárással előállított sejteket szaporító tápközegben szaporítjuk, azután a VIII. faktorének megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérjét a tápoldatból izoláljuk.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a fehérjeként emberi VIII. faktort állítunk elő.

14. A 12. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a fehérjeként az 1. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciájú (a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvenciájú) fehérjét állítunk elő.

15. Emberi lymphoma sejtekből és 293S sejtekből származó emberi sejtvonal, amely nagy mennyiségben expresszál a VIII. faktorének megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérjét.

16. A 15. igénypont szerinti emberi sejtvonal, amely HKB11 sejtekből (ATCC CRL-12568) származik.

17. Emberi lymphoma sejtekből és 293S sejtekből származó emberi sejtvonal, amely plazmaeredetű proteinektől mentes tápoldatban nagy mennyiségben expresszál a VIII. faktorének megfelelő prokoaguláns aktivitású fehérjét.



18. A 17. igénypont szerinti emberi sejtvonallal, amely HKB11 sejtekből (ATCC CRL-12568) származik.

19. 20B8 elnevezésű sejtvonallal (ATCC CRL-12582).

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivőjelölt

23 oldal
5 oldal oldal

28 oldal
Jensen



1	ATTRYYLGAV	ELSWDYMQSD	LGELPVDARF	PPRVPKSFPE	NTSVVYKCTL
51	FVEFTVHLFN	IAKPRPPWVG	LLGPTIQAEV	YDTVVITLKN	MASHPVSLHA
101	VGVSYWKASE	GAEYDDQTSQ	REKEDDKVFP	GGSHTYVWQV	LKENGPMASD
151	PLCLTYSYLS	HVDLVKDLNS	GLIGALLVCR	EGSLAKEKTQ	TLHKFILLFA
201	VFDEGKSWHS	ETKNSLMQDR	DAASARAWPK	MHTVNGYVNR	SLPGLIGCHR
251	KSVYWHVIGM	GTTPEVHSIF	LEGHTFLVRN	HRQASLEISP	ITFLTAQTL
301	MDLGQFLLFC	HISSHQHDGM	EAYVKVDSCP	EEOQLRMKNN	EEAEDYDDDL
351	TDSEMDVVRF	DDDNSPSFIQ	IRSVAKKHPK	TWVHYIAAEE	EDWDYAPLVL
401	APDDRSYKSQ	YLNNGPQRIG	RKYKKVRFMA	YTDEFKTR	AIQHESGILG
451	PLLYGEVGD	LLIIFKNQAS	RPYNIYPHGI	TDVRLYSRR	LPKGVKHLKD
501	FPILPGEIFK	YKWTVTVEDG	PTKSDPRCLT	RYYSSFVNME	RDLASGLIGP
551	LLICYKESVD	QRGNQIMSDK	RNVILFSVFD	ENRSWYLTEN	IQRFLPNPAG
601	VQLEDPEFQA	SNIMHSINGY	VFDSLQLSVC	LHEVAYWYIL	SIGAQTDFLS
651	VFFSGYTFKH	KMVEDTLTL	FPPSGETVFM	SMENPGLWIL	GCHNSDFRNR
701	GMTALLKVSS	CDKNTGDYYE	DSYEDISAYL	LSKNNAIEPR	SFSQNPPVLK
751	RHQREITRRT	LQSDQEEIDY	DDTISVEMKK	EDFDIYDEDE	NQSPRSFQKK
801	TRHYFIAAVE	RLWDYGMSSS	PHVLRNFAQS	GSPQFKKVV	FQFTDGSFT
851	QPLYRGELNE	HLGLLGPYIR	AEVEDNIMVT	FRNQASRPYS	FYSSLISYEE
901	DQRQGAEPK	NFVKPNETKT	YFWKVQHHMA	PTKDEFDCKA	WAYFSDVDLE
951	KDVHSGLIGP	LLVCHTNTLN	PAHGRQVTQ	EFALFFTIFD	ETKSWYFTEN
1001	MERNCRAPCN	IQMEDPTFKE	NYRFHAINGY	IMDTPGLVM	AQDQIRWYL
1051	LSMGSNENIH	SIHFSGHVFT	VRKKEEYKMA	LYNLYPGVFE	TVEMLPKAG
1101	IWRVECLIGE	HLHAGMSTLF	LVYSNKCQTP	LGMASGHIRD	FQITASQYGG
1151	QWAPKLARLH	YSGSINAWST	KEPFSWIKVD	LLAPMIIHGI	KTQGARQKFS
1201	SLYISQFIIM	YSLDGKKWQT	YRGNSTGTL	VFFGNVDSSG	IKHNI FN PPI
1251	IARYIRLHPT	HYSIRSTLRM	ELMGCDLNSC	SMPLGMESKA	ISDAQITASS
1301	YFTNMFATWS	PSKARLHLQG	RSNAWRPQVN	NPKEWLQVDF	QKTMKVTGVT
1351	TQGVKSLTTS	MYVKEFLISS	SQDGHQWTLF	FQNGKVKVFQ	GNQDSFTPVV
1401	NSLDPPLLTR	YLRIHPQSWV	HQIALRMEVL	GCEAQDLY	



GGCAATGGAG CGTGAAGAAG GGCCCCAGGG CTGACCCCGG CAAACGTGAC (50)
CCGGGGCTCC GGGGTGACCC AGGCAAGCGT GGCCAAGGGG CCCGTGGGTG (100)
ACACAGGCAA CCCTGACAAA GGCCCCCAG GAAAGACCCC CGGGGGGCAT (150)
CGGGGGGGTG TTGGCGGGTC ATGGGGGGGG CGGGTCATGC CGCGCATTCC (200)
TGAAAAAAGT GGAGGGGGCG TGGCCTTCCC CCCGCGGCC CCTAGCCCC (250)
CCGCAGAGAG CGGCGCAACG GCGGGCGAGC GGCGGGGGGT CGGGGTCCGC (300)
GGGCTCCGGG GGCTGCGGGC GGTGGATGGC GGCTGGCGTT CCGGGGATCG (350)
GGGGGGGGTC GGGGGGCGCT GCGCGGGCGC AGCCATGCGT GACCGTGATG (400)
AG (402)

2. ábra

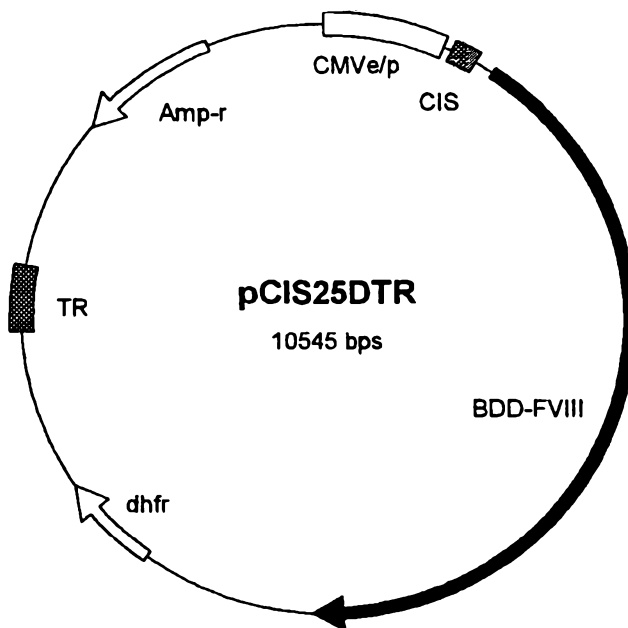
P0200558

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

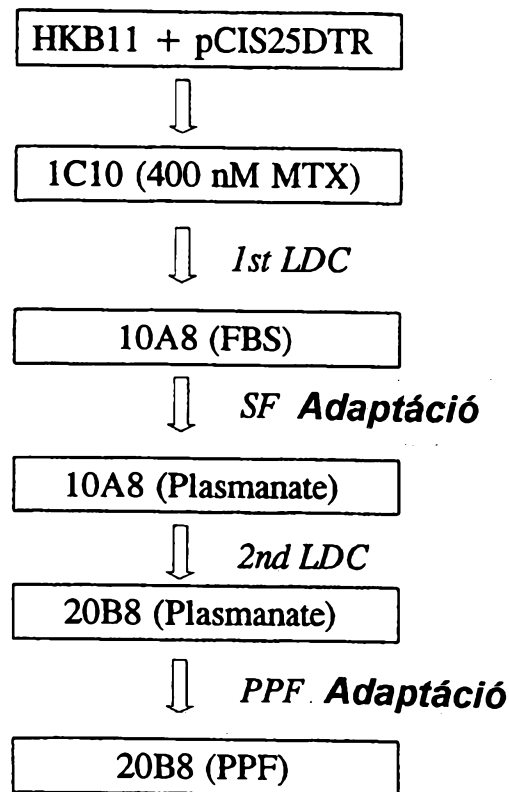


~~PCT/US99/29169~~

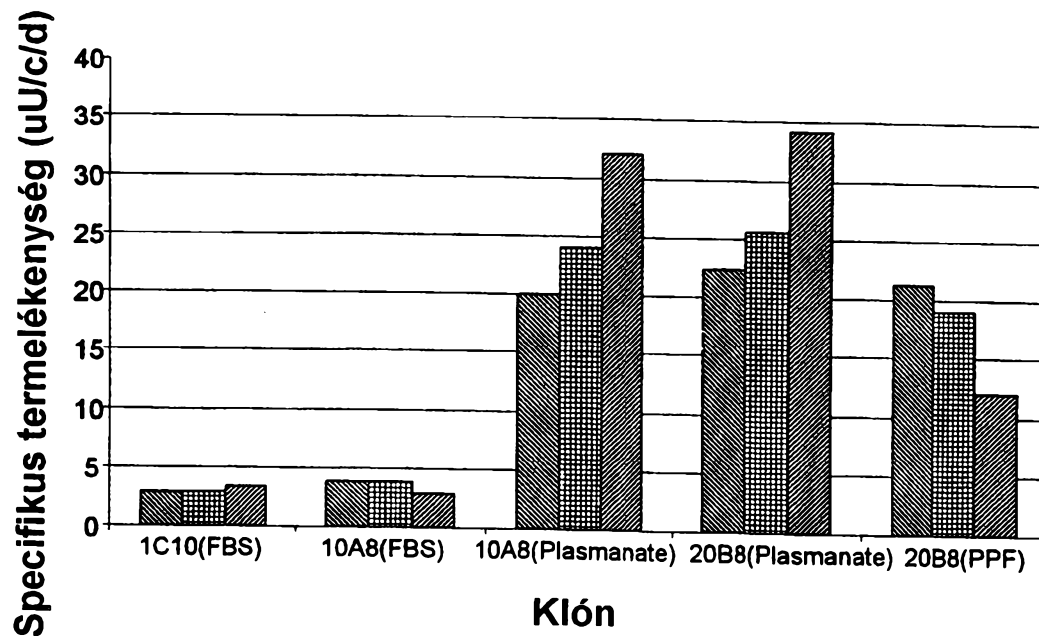
3/5



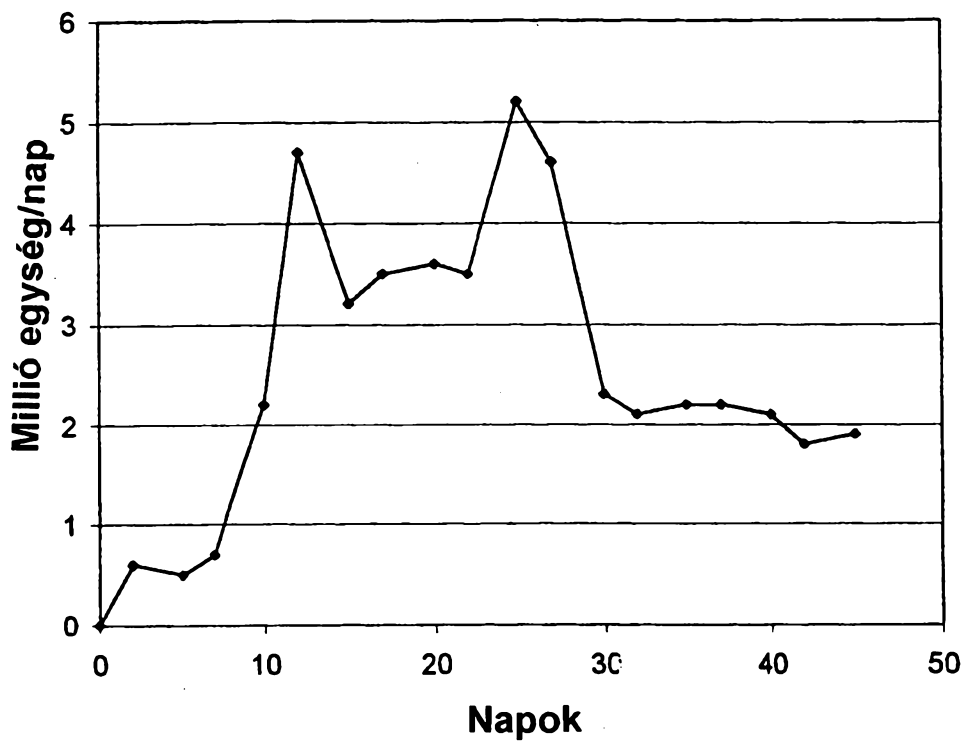
3. ábra



4A ábra



4B ábra



5. ábra