

Rekombináns vérlemezke Glikoprotein-VI kollagén-  
receptor és gyógyászati alkalmazása

## K I V O N A T

A találmány tárgyát Glikoprotein-VI (GPVI), annak izolálása, tisztítása és rekombináns előállítási eljárásai képezik. Közelebbről a találmány tárgya GPVI, előnyösen rekombináns GPVI alkalmazása véralvadási rendellenességekkel, mint például trombózisos vagy kardiovaszkuláris betegségekkel közvetlenül vagy közvetve korreláló betegségek vagy patológiás események kezelésére. Az extracelluláris rekombináns fehérje alkalmazható lehet membránkötött GPVI potenciális inhibitorainak megtalálására szolgáló szkrínelő vizsgálati eljárások létrehozására is, a trombociták és vérlemezkék kollagénhez való kötődésének gátlása érdekében. A GPVI szintjének változásai alkalmazhatók lehetnek a vérlemezkék korának és trombózisos vagy kardiovaszkuláris betegségeknek való kitétségnek a követésére.

Jellemezés: 1. sz. p.

2. sz. p.



**Rekombináns vérlemezke Glikoprotein-VI kollagén-  
receptor és gyógyászati alkalmazása**

A találmány tárgyát Glikoprotein-VI (GPVI), annak izolálása, tisztítása és rekombináns előállítási eljárásai képezik. Közelebbről a találmány tárgya GPVI, előnyösen rekombináns GPVI alkalmazása véralvadási rendellenességekkel, mint például trombotikus vagy kardiovaszkuláris betegségekkel közvetlenül vagy közvetve korreláló betegségek vagy patológiás események kezelésére. Az extracelluláris rekombináns fehérje alkalmazható lehet membránkötött GPVI potenciális inhibitorainak megtalálására szolgáló szkrínelő vizsgálati eljárások létrehozására is, a vérlemezkek kollagénhez való kötődésének gátlása érdekében. A vérlemezkek felszínén lévő GPVI módosul a vérlemezke élettartama alatt *in vivo*, és ezáltal alkalmazható a vérlemezkek korprofiljának markereként.

A glikoprotein-VI egy 62/65 kDa (sorrendben nem redukált és redukált) molekulatömegű vérlemezke membránfehérje, amely komplexet alkot az Fc $\gamma$  közös alegységével. A GPVI-alegység tartalmazza a kollagén kötőhelyet, és az Fc $\gamma$ -alegység felelős a jelátvitelért. A komplex alkotja az egyik fő kollagénreceptort a vérlemezke felszínén, ami kritikus a vérlemezke kollagénre válaszként adott aktiválásáért. A kollagén felismerési szekvenciája (GlyProHyp)<sub>n</sub> szekvenciákból áll. Japánból ismertek olyan betegek, akiknek



genetikus GPVI-hiánya van. Enyhe vérzékenységi problémáik vannak, és a vérlemezkék csak gyengén reagálnak a kollagénre, feltehetően más receptorokon keresztül. Sokat megtudtunk a GPVI-től induló jeltovábbítási kaszkádról, amely nagyon hasonlít az immunreceptoroktól, beleértve T-sejt-receptoroktól, B-sejt-receptoroktól és természetes ölüsejtekől indulókra. Ezen kaszkádok src-családba tartozó tirozin-kinázokat, mint például Fyn és Lyn, valamint p72<sup>SYK</sup> és sok más tirozin-kinázt és foszfatázt és adaptorfehérjéket, mint például LAT-ot tartalmaznak. Ezen kaszkádok fő célpontja a foszfolipáz-C $\gamma$ 2 aktiválása, amely foszfolipideket hasít, diacilglicerol és IP<sub>3</sub> másodlagos hírvivőket eredményezve. A GPVI-ről azt tartják, hogy a vérlemezke  $\alpha$ 2 $\beta$ 1-integrinjének aktiválásában vesz részt, amelynek fő szerepe van a vérlemezke tapadásában a sérült érfalhoz. Az Fc $\gamma$ -alegységet hatástalanítva tartalmazó („knocked-out”) egereknek olyan vérlemezkék vannak, amelyek még mindig mutatják a kollagénre adott választ, célozva arra, hogy az  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 nyugalmi állapotát szintén a GPVI/Fc $\gamma$  komplex szabályozza.

A vérlemezke GPVI kollagénreceptora közeli rokona a természetes ölüsejtek p58KAR-családba tartozó aktiváló receptorainak, valamint Fc $\alpha$ R-nek.

A nyugalmi, keringésben lévő vérlemezkék tapadása és aktiválása az érsérülés helyén az első lépés a vérrög kialakulásához vezető folyamatban, amely vérzésselállító dugóvá alakul. A kollagén a vérfal vérlemezke-aktiválásért felelős egyik fő komponense. Sokféle típusú kollagén létezik,



és ezek közül hét található az endotélium alatti rétegekben. Számos különböző kollagénreceptort azonosítottak a vérlemezkék felszínén, de a jelenleg az  $\alpha 2\beta 1$ -integrint és a nem integrin GPVI-t tartják a fő receptoroknak. Habár az  $\alpha 2\beta 1$  jól jellemzett, és mindkét alegységét klónozták és szekvenálták több évvel ezelőtt, a GPVI szerkezete meghatározatlan maradt, habár számos jellemzőjét azonosították. Körülbelül 20 évvel ezelőtt meghatározták, hogy a GPVI egy fő vérlemezke-fehérje 60-65 kDa tartományba eső molekulatömeggel és savas pI-vel. Feltételezett kollagénreceptorként való szerepét azután állapították meg, hogy Japánban azonosítottak egy beteget enyhe vérzési rendellenességgel, akinek a vérlemezkéi specifikus hibát mutattak a kollagénre adott válaszbán, és nem volt ilyen receptoruk. Ez a beteg auto-ellenanyagokat is termelt a hiányzó receptor ellen, és ezeket alkalmazták a molekula további jellemzésére. Nem olyan régen megállapították, hogy a GPVI nem kovalensen kapcsolódik a közös Fc $\gamma$ -alegységhez, amely a komplex jelto-  
vábbító részeként működik. Azt is demonstrálták, hogy a GPVI kollagénen lévő felismerési szekvenciája ismétlődő Glt-Pro-Hyp triplett a kollagén tripla-hélix szerkezetén belül, és hogy az ezen a szerkezeten alapuló szintetikus peptidek alkalmazhatók specifikus, GPVI elleni antagonistákként. A GPVI/Fc $\gamma$ -komplexről kimutatták, hogy immunreceptor-szerű mechanizmussal továbbít jeleket a vérlemezke belsejébe, amiben részt vesz a p72<sup>SYK</sup> aktiválása, és kináz/foszfatáz/adaptorfehérje kölcsönhatások kaszkádja révén PLC $\gamma$ 2 aktiválásához vezet, és ezáltal granulumok felszaba-



dulásához és a vérlemezkék aggregációjához. A molekula jellemzésének egy további lépése volt annak a demonstrálása, hogy a trópusi *Crotalus durissus terrificus* kígyóból származó C-típusú lektin, a convulxin, képes volt aktiválni a vérlemezkéket, a GPVI multimer kölcsönhatás révén történő csoportosításával. A convulxinról kimutatták, hogy specifikusan a GPVI-hez kötődik, ezáltal fennálló megközelítési módokkal együttesen módot nyújt a receptor tisztítására.

Ily módon nyilvánvaló a technika állása alapján, hogy a GPVI nagyon érdekes vegyületnek tűnik számos terápiás területen, mindennekfelett kollagén-vérlemezke kölcsönhatásoktól függő véralvadási eseményekkel közvetlenül vagy közvetve kapcsolatos alkalmazásokkal kapcsolatban. A találmány célja az volt tehát, hogy rekombináns GPVI-t biztosítsunk, és megmutassuk annak hatásosságát közvetlen terápiás célanyagként vagy olyan rövid vegyületekre, különösen kémiaiilag szintetizált vagy szintetizálható vegyületekre történő szkrínelés eszközeként, amelyek a természetes vérlemezke-kollagén kölcsönhatás inhibíciójának vagy gátlásának képességével rendelkeznek.

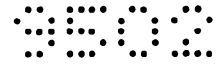
A találmány tárgyát képezik továbbá a GPVI-fehérje részei vagy fragmensei, amelyek megőrizték biológiai aktivitásukat, ami a kollagénhez való kötődés.

A találmány sikerrel járt elegendő mennyiségű GPVI megtisztításában, előzetes jellemzésére és peptidszekvenálásra. A szekvenciákat PCR-láncindítók tervezésére alkalmaztuk, ily módon pozitív szekvenciákat azonosítottunk DNS-könyvtárban. Azután ezt a DNS-szekvenciát alkalmaztuk pró-



baként majdnem teljes cDNS-szekvencia izolálására a könyvtárból, és a hiányzó 5' szekvenciát RACE eljárás alkalmazásával kaptuk meg vérlemezke cDNS-könyvtárból.

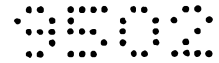
A találmány szintén sikerrel járt a rekombináns GPVI terápiásan alkalmazható vegyületként történő alkalmazásának kimutatásában, amely képes például sérült erekkel rendelkező betegnek beadva kollagénhez kötődni, ezáltal megakadályozva membrán-kötött GPVI-t tartalmazó vérlemezkek kollagénhez való kötődését. A GPVI rekombináns oldható extracelluláris doménja tartalmazza a kollagén kötőhelyet, és megakadályozhatja a vérlemezke kollagén általi aktiválását. Tehát alkalmas lehet megnövekedett kollagén általi vérlemezke aktiválással járó betegségek, mint például atheroszklerotikus vérlemezke-repedés, nem stabil angina kezelésére, vagy műtéti kezelés, mint például Perkután Transzlumináris Koronaér-Angioplastia (PTCA) során, ahol az artériákat újra megnyitják ballon-katéter felfújása révén, ami jelentékeny sérülést és vérlemezke-aktiválást okoz az érfalban, és gyakran eredményezi az ér későbbi újraelzáródását. A rekombináns GPVI-fragmensek előnye a jelenlegi kezelési eljárásokhoz viszonyítva az, hogy korábbi stádiumban hatnak a vérlemezke-aktiválás megelőzése vagy csökkentése révén, semmint az események vérlemezke-aktiválás utáni szupresszállásával, mint például GPIIb-IIa-antagonisták általi aggregációval. Ily módon kisebb mennyiségű vérlemezkegranulom-tartalom szabadul fel, beleértve növekedési faktorokat és kemokineket, amelyek nemcsak a sérülés kijavításában, hanem az érfal újrakialakításában is részt vesznek,



simaizom-vándorlás és a fagocitáló sejtek - mint például az ateroszklerózishoz kialakulásához ismert módon hozzájáruló monociták - odavonzása révén. GPVI elleni emberiesített egér monoklonális ellenanyagok Fab-fragmensei alkalmazhatók hasonló hatással a vérlemezke felszínén lévő GPVI gátlására a fentiekhez hasonló alkalmazásokban.

A találmány szerinti rekombináns GPVI alkalmazható kollagénkötési vizsgálati eljárásokban is, ezen kölcsönhatás gátlására képes kismolekulák (például kombinatorikus könyvtárakban) szkrínelésére, és amelyek alkalmazhatók kollagén-vérlemezke közötti kölcsönhatást gátló terápiás vegyületek kifejlesztésére. Megfelelő származtatással ezen vegyületek orálisan beadhatókká tehetők. Még egyszer, a fő cél GPVI-kollagén közötti kölcsönhatást, és ennél fogva vérlemezke-aktiválást olyan szituációkban csökkentő vegyületek előállítására, ahol a vérlemezkek érintkezésbe kerülnek kollagénnel. A találmány szerint alkalmazott szkrínelési technológia, mint olyan, jól megalapozott a technika állása szerint. Ilyen szkrínelési vizsgálati eljárások révén a találmány lehetővé teszi új célanyagok megtalálását és kifejlesztését, amelyek gátolhatják a vérlemezke felszínén lévő, természetesen membránkötött GPVI kollagén-inhibitoroként való működését. Az ilyen célanyagok, amelyek kismolekulák lehetnek, további találmányok alapjául szolgálhatnak.

GPVI és GPVI specifikus doménjait felismerő reagensek másik fő alkalmazása vérlemezke korának és működőképességének markereként való alkalmazás. A fiatal vérlemezkekről általában azt tartják, hogy aktívabbak és működőképesebbek,



mint az öregebbek. A fiatal vérlemezkék kötődnek a GPVI-re specifikus C-típusú lektinhez, a convulxinhoz, és aktiválódnak általa, és ahogy öregednek, mind a kötődés, mind az aktiválódás mértéke csökken. Ez vagy proteolitikus vagy konformációs változások, vagy az Fc $\gamma$ -alegységhez történő kapcsolódása miatti vérlemezke-aktiválódás, vagy a keringésben bekövetkező sérülés következménye lehet. Ez hasznos paraméter lehet vérlemezkék kor- és működési profiljának mérésére betegekben, valamint normális személyekben orvosi ellenőrzések során. A vérlemezkék korprofilja sok csontvelőt vagy immunrendszert érintő betegségben megváltozik, és fontos diagnosztikus kritérium lehet, ha rendelkezésre állnak jobb eljárások a meghatározására. Például megnövekedett vérlemezke átalakulási sebességgel járó betegségben szenvedő betegek több fiatal vérlemezkét mutathatnak, míg kemoterápián vagy sugárkezelésen lévő betegek folyamatosan idősödő populációt mutathatnak. Ezáltal egy ilyen korprofil alkalmazható kezelés pontos követésére. Normális egészséges populációban nagyon keveset tudunk a korprofil-eloszlásról és annak szerepéről az egészségi állapotban bekövetkező változások jóslásában. Nem ismert, hogy vajon a GPVI változásai a vérlemezkék vérzésselállítási eseményekben való részleges részvételének következményei-e, és vajon a változások kifejezettebbé válnak-e kiterjedt kardiovaszkuláris betegségben szenvedő betegekben. Jelenleg tiazolnarancsot alkalmaznak fiatal, mRNS-t tartalmazó hálós vérlemezkék detektálására. Ez az mRNS hamarosan lebomlik, csak a legfiatalabb vérlemezkékre korlátozva az eljárást. Ilyen



vizsgálati eljárásokban alkalmazható reagensek közé tartozhatnának GPVI-specifikus kígyóméreg-fehérjék, mint például convulxin, vagy a GPVI N-terminális régióját felismerő monoklonális vagy poliklonális ellenanyagok, vagy az N-terminális domén proteolízis révén felfedett új helyeit vagy konformációit felismerő monoklonális ellenanyagok, vagy akár az intakt molekulán és nem az éretten, akár fordítva jelen lévő specifikus konformációkat felismerő monoklonális ellenanyagok, vagy kisméretű kémiai vegyületek, amelyeket intakt GPVI vagy módosított formáinak specifikus felismerésére szelektáltak. Ezen reagenseket fluoreszcens jelzőkkel jelölhetnénk, vagy fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyaggal vagy affinitási reagenssel együtt áramlási citometriában alkalmazhatnánk a vérlemezkék kötési profiljának mérésére. Későbbi stádiumban más megoldásként kevésbé munkaigényes, a vérlemezkeprofilok automatikus mérésén alapuló mérési módszereket adoptálhatunk. Áramlási citometria vagy mágneses gyöngyök révén történő sejtválogatás alkalmazásával lehetséges lenne a fiatal és öreg vérlemezkék izolálása, és így módon az öreg vérlemezkék keringésből történő eltávolításában részt vevő faktorok vizsgálata. GPVI specifikus formáit felismerő reagensek lennének az ilyen vizsgálatok kulcsai.

Tehát a találmány célja Glikoprotein-VI-ot vagy annak biológiailag aktív fragmensét kódoló DNS, különösen a 2. ábrán bemutatott szekvencia biztosítása.



A találmány célja továbbá az 1a és 1b ábákon bemutatott aminosav-szekvenciát tartalmazó glikoprotein-VI-ot kódoló DNS biztosítása.

A találmány egy másik célja rekombináns glikoprotein-VI-ot gyógyászatilag elfogadható hordozóval vagy kötőanyaggal együtt tartalmazó gyógyászati készítmény biztosítása, és annak alkalmazása vérlemezke-kollagén kölcsönhatásokkal kapcsolatos trombotikus és kardiovaszkuláris események és rendellenességek terápiás területén alkalmazható gyógyszer gyártására.

A találmány egy másik célja rekombináns glikoprotein-VI alkalmazása vérlemezke-kollagén kölcsönhatások specifikus inhibitorainak detektálásra szolgáló szkrínelő módszerben.

A találmány egy másik célja glikoprotein-VI alkalmazása vérlemezkek korának és kardiovaszkuláris betegség kockázatának markerként.

Lehetséges orvosi indikációk és alkalmazások például nem stabil angina pectoris, PTCA, feszítők alkalmazása ezen a szakterületen, koronaér-műtétek, általános műtétek vérereken, olyan műtétek, amelyek megsérthetnek nagyobb véreket, mint például medenceízület-műtétek. Ezenfelül az összes olyan indikáció ide értendő, amelyek az érfal és a koagulációs rendszer kölcsönhatása által okozott, vérrögkialakulás és erek elzáródásának nagy kockázatával járó tromboembolikus eseményekkel kapcsolatosak.



Mint ahogyan fent jeleztük, GPVI-fehérje és annak fragmensei a találmány szerint alkalmasak gyógyászati hatóanyagként gyógyászati készítményekben és kombinációkban.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények opcionálisan tartalmazhatnak további hatóanyagokat is, például antikoagulánsokat, mint például hirudint vagy heparint, vagy trombolitikus reagenseket, mint például plazminogén-aktivátort vagy hementint, vagy egyéb vérlemezke-receptorok antagonistáit, mint például GPIIa-IIb-antagonistákat, például abciximabot vagy eptifibatidot, vagy ADP-receptor-antagonistákat, mint például clopidogrelt.

A fehérje és annak biológiailag aktív fragmensei a találmány szerint gyógyászatilag elfogadható sók kepezhetnek bármilyen nem toxikus, szerves vagy szervetlen savval. Szervetlen savak például sósav, brómsav, kénsav vagy foszforsav, és savas fémsók, mint például nátrium-monohidrogén-ortofoszfát és kálium-hidrogén-szulfát. Szerves savak például mono-, di- és trikarboxilsavak, mint például ecetsav, glikolsav, tejsav, piroszőlősav, malonsav, borostyánkősav, glutársav, fumársav, almasav, borkősav, citromsav, aszkorbinsav, maleinsav, hidroximaleinsav, benzoésav, hidroxibenzoésav, fenilecetsav, fahéjsav, szalicilsav, és szulfonsavak, mint például metánszulfonsav. A karboxil-terminális aminosav-oldalláncának sói közé tartoznak a nem toxikus karboxilsav-sók bármilyen megfelelő szervetlen vagy szerves bázissal. Ezek közé tartoznak például alkálifémek, mint például nátrium és kálium, alkáliföldfémek, mint például kalcium és magnézium, IIIA csoportba tartozó könnyűfémek,



köztük alumínium, és szerves primer, szekunder és terciér aminok, mint például trialkilaminok, köztük trietilamin, prokain, dibenzilamin, 1-eténamine, N,N'-dibenziletiléndiamin, dihidroabietilamin és N-alkilpiperidin.

A leírás szerinti értelemben a „gyógyászatiilag elfogadható hordozó” kifejezés alatt inert, nem toxikus szilárd vagy folyékony töltőanyagot, oldószert vagy burkolóanyagot értünk, amely nem reagál hátrányosan a hatóanyaggal vagy a beteggel. Megfelelő, előnyösen folyékony hordozók jól ismertek a technika állása szerint, mint például steril víz, sóoldat, dextróz vizes oldata, cukoroldatok, etanol, glikolok és olajok, köztük petroleum, állati, növényi vagy szintetikus eredetűek, például földimogyoró-olaj, szójaolaj és ásványi olaj.

A találmány szerinti kiszerezést hagyományos, nem toxikus gyógyászatiilag elfogadható hordozókat, oldószereket, adjuvánsokat és hordozóeszközöket tartalmazó egységdózisokban adhatjuk be, amelyek tipikusak parenterális beadás esetén.

A „parenterális” kifejezés a leírás szerinti értelemben szubkután, intravénás, intraartikuláris és intratracheális injekciós és infúziós módszereket tartalmaz. Egyéb beadási módok, mint például orális és helyi beadás is megfelelő. Parenterális készítmények és kombinációk legelőnyösebben intravénásan adhatók be bólusz alakban, vagy állandó infúzióval, ismert eljárások szerint. Orális beadásra szolgáló tabletták és kapszulák hagyományos kötőanyagokat tartalmaznak, mint például kötőreagenseket, töltőanyagokat,



oldószereket, tablettázó reagenseket, kenőanyagokat, bomlasztószereket, és nedvesítőszereket. A tablettákat be is vonhatjuk a szakirodalomban jól ismert eljárások szerint.

Orális folyadékkészítmények vizes vagy olajos szuszpenziók, oldatok, emulziók, szirupok vagy elixírek lehetnek, vagy száraz termékek, vízzel vagy más megfelelő anyaggal használat előtti feloldás céljára. Az ilyen folyadékkészítmények hagyományos adalékanyagokat tartalmazhatnak, például szuszpendáló reagenseket, emulgeálószeret, nemvizes hordozókat és tartósítószeret.

Helyileg beadott kiszerezések lehetnek vizes vagy olajos szuszpenziók, emulziók, zselék vagy előnyösen emulziós kenőcsök.

A találmány szerinti egységdózisok tartalmazhatják a találmány szerinti fehérje napi szükséges mennyiségét, vagy annak törtrészeit a kívánt dózis eléréséhez. Az optimális terápiásan elfogadható dózis és dozírozás egy adott beteg (emlős, köztük ember) esetén számos tényezőtől függ, mint például az alkalmazott specifikus hatóanyag aktivitásától, kortól, testtömegtől, általános egészségi állapottól, nemtől, étrendtől, beadás idejétől és útjától, kiürülés sebességétől, a kezelés céljától (azaz terápia vagy profilaxis), és a kezelendő trombotikus betegség természetétől (vérlemezke elleni vagy antikoaguláns aktivitás).

Tehát kezelt betegben (*in vivo*) antitrombotikumként alkalmas készítményekben és kombinációkban a találmány szerinti peptidek hatásos napi gyógyászati dózisa körülbelül 0,01 és 100 mg/testtömeg kg között van, előnyösen 0,1 és 10



mg/testtömeg kg között. A beadási alak szerint egyetlen dózis 0,5 és 10 mg közötti kollagén-inhibitort tartalmazhat. Testen kívüli vérben antikoaguláns hatás eléréséhez a találmány szerinti peptidek gyógyászatilag hatásos mennyisége 0,2 és 150 mg/l között van, előnyösen 1 és 20 mg/l között.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz tartozó ábrákat:

Az 1. ábrán a GPVI fehérjeszekvenciáját mutatjuk be (egybetűs kóddal). Az 1a ábrán a vezetőszekvenciát, az 1b ábrán az érett fehérjét mutatjuk be:

Nyílt leolvasási fázis (ORF):	339 aminosav
Csillag:	glikozilációs hely
Kettős aláhúzás:	transzmembrán domén
Aláhúzás:	szekvenált peptidek

A 2. ábrán a GPVI nukleinsav-szekvenciáját mutatjuk be, amely az 1017 bázispár hosszúságú nyílt leolvasási fázist és a 3' és 5' régiókat tartalmazza, összesen 1249 bpt.

Kettő darab, a genetikai kódban legkisebb degeneráltságot mutató, 7 aminosav hosszúságú szekvenciát választottunk ki DNS-láncindítók szintézisére annak érdekében, hogy a GPVI-cDNS egy részét PCR-rel amplifikáljuk. Mivel mindkét peptid elhelyezkedése teljesen ismeretlen volt a fehérjében, mindegyikre két degenerált láncindítót, egy szensz és egy antiszensz láncindítót állítottunk elő. Ezeket a láncindítókat alkalmaztuk emberi csontvelő-könyvtár amplifikálására. A PAMKRSL-szekvenciát kódoló, szensz 5' TYA THC CNG CNA TGA ARMG 3' láncindítónak a DQFALYK-szekvenciának meg-



felelő antiszensz 5' TTR TAN ARN GCR AAY TGR TC 3' láncindítóval történő kombinációjával egy 221 bázispár hosszúságú fragmenst amplifikáltunk. A kiválasztott peptidek mellett az amplifikált DNS a DQLELVATGVFAKPSLSAQPGPAVSS-szekvenciájú LysC/AspN-peptidet kódolta, egyértelműen kapcsolatba hozva a szekvenciát a GPVI-cDNS-ével.

600000 pfu szkrínelése a csontvelő-könyvtárból ezzel a 221 bázispár hosszúságú DNS-fragmenssel 4 pozitív pfu-t eredményezett. Háromban 1350 bázispár hosszúságú inzert volt a Sal I vagy Eco RI restriktív enzimek valamelyikével hasítva, és az IgG-szuperfamilia tagjai voltak. A negyedikben egy 4,6 kb hosszúságú inzert volt Sal I enzim emésztéssel, és Eco RI-kezeléssel két, sorrendben 2300 illetve 1300 bázispár hosszúságú fragmens keletkezett. A DNS-e kódolta a GPVI aminosav-szekvenálásából származó 10 peptidet, de nem tartalmazta az amino-terminált. Nem találtunk indító metionint vagy szignálszekvenciát, de több mint 2000 bázispár hosszúságú, Alu-szekvenciában végződő, korábban szekvenált, nem olvasási fázisban lévő DNS volt jelen. Az 5' RACE-PCR kísérletet vértelen polioA RNS-sel hajtottuk végre, a GPVI-szekvencia olyan részén lévő láncindítók alkalmazásával, amelyeket a peptidek szekvenciái megerősítettek. Azt találtuk, hogy a 348 bázispár hosszúságú fragmens, amely a negyedik klónból 278 bp-nyi szekvenciát és az 1987. bázispártól 70, 14 aminosavnak, köztük az első metioninnak megfelelő új bázispárt tartalmazott, visszatér a már meglévő GPVI-szekvenciához. Ezáltal megszekvenálhattunk egy olyan 1249 bázispár hosszúságú cDNS-t, amely a kezdő kodontól le-



olvasással ellentétes irányban lévő 25 bp-t, 1017 bázispár hosszúságú, 339 aminosavnyi nyílt leolvasási fázist, beleértve a vezetőszekvenciát is, és 207 bp-nyi 3' régiót, beleértve a stop kodont is tartalmazott.

A vérlemezke GPVI-t kódoló cDNS-t emberi csontvelőkönyvtárból klónoztuk és szekvenáltuk, RACE alkalmazásával, vérlemezke mRNS-sel pótolva a hiányzó 5' szekvenciát. Az 1017 bázispár hosszúságú nyílt leolvasási fázis 339 aminosavat és nem transzlálódó 3' régiót kódol. Az aminosavszekvencia hidrofóbitási elemzése feltárta két feltételezett transzmembrán domén, egy 20 aminosav hosszúságú feltételezett szignálszekvencia, és egy 19 aminosav hosszúságú domén jelenlétét az érett fehérje 247. és 265. oldalláncai között. A szekvenciát és annak aminosav-transzlációját a 2. és 1. ábrákon mutatjuk be. GeneBank keresésben talált leg-hasonlóbb molekulák aminosav-szekvenciákkal való összehasonlítás egyértelműen feltárja, hogy az immunglobulin-szuperfamilia tagja, és az extracelluláris domén két, két diszulfid-híd által alkotott Ig C2-domén hurkot tartalmaz. Membránon átérő fehérjék első osztályába tartozó molekula, az N-terminálissal a külső oldalon, és egyszer keresztezi a membránt. A legközelebbi rokon molekulák a természetes öljősejt-receptorok olyan osztályába tartoznak, amelyek mind inhibitor, mind aktivátor típusokat tartalmaznak. A GPVI egyértelműen az aktivátor-alosztályba tartozik, nemcsak a funkciója révén, hanem azért is, mert ellentétben az inhibitor-alosztállyal, nem tartalmaz ITIM-szekvenciákat a citoplazmatikus doménjában. Nem tartalmaz tirozin-oldallán-



cokat sem, amelyek foszforilációban vehetnének részt. Van néhány treonin és szerin oldallánc ebben a doménben, de azok nem felelnek meg semmilyen kináz konszenzus szekvencia kritériumának. Mint az NK-receptorok aktivátor-alosztályába tartozó fehérjék, a GPVI arginin-oldalláncot tartalmaz 3. aminosavként a membránt keresztező régióban, ami az Fc $\gamma$ -alegységgel való komplex-képzésben vesz részt. A citoplazmatikus domén 51 aminosavat tartalmaz, csak kis hasonlóságot mutatva (rögtön a membrán alatt lévő régióban) ezen család más tagjainak citoplazmatikus doménjeivel. Ez azt sugallja, hogy ez a domén a GPVI-ben más típusú citoplazmatikus molekulákkal állhat kapcsolatban, mint a többi családtag. A GPVI csak egyetlen feltételezett N-glikozilációs helyet tartalmaz a 69. aszparaginnál. Azonban a rögtön a membrán felett lévő domén az Ig-domének béta-redői után gazdag treonin és szerin oldalláncokban, amelyek O-glikozilációs helyeket biztosíthatnak, mint amilyeneket a GPIb $\alpha$ -ban és GPV-ben találunk. Ezen O-glikoziláció fő funkciója úgy tűnik az, hogy a vérlemezke felszínétől eltávolítva prezentálja a receptor-szerkezeteket, ily módon elősegítse a kölcsönhatásukat a nagy terjedelmű ligandumaikkal. Mivel a GPVI-t korábban szialoglikoproteinnek írták le, az elméleti molekulatömeg (37 kDa) és a gélelektroforézissel meghatározott molekulatömeg (65 kDa redukáltan) közötti különbség ezen glikoziláció miatt kell, hogy legyen.

A két doménnel rendelkező típusba tartozó természetes ölösejt-receptorok szerkezetét röntgen-krisztallográfiás vizsgálatokkal állapították meg, és megmutatták, hogy a két



domén hegyesszöget zár be a könyök külső oldalán fekvő, peptidet hordozó HLA-antigének receptorhelyével. A HLA-peptid kötőhelye és a kollagén kötőhelye szerkezetének közvetlen összehasonlítása azonnal sugallja azt, hogy miért közös ezeknek a receptoroknak az eredete; azért, mert a HLA-kötőhely többszörös alfa-helikális szerkezetei és az általa tartalmazott peptid nagyon hasonlít a kollagén tripl-hélix szerkezetére. A természetes ölüsejt-receptorokról feltételezik, hogy dimerizációs mechanizmussal működnek, két receptor két különböző HLA-helyet ismer fel a természetes ölüsejt által vizsgált sejten. Lehetséges, hogy ez a dimerizáció része az aktiválási vagy deaktiválási mechanizmusnak, a receptor alosztályától függően. A GPVI esetében lehetséges az is, hogy két GPVI kapcsolódjon egy Fc $\gamma$ -alegységgel, mivel az Fc $\gamma$ -dimer mindegyik monomerének van egy felismerési szekvenciája. Azonban a sztöchiometria még nem ismert, és a kollagének, és a GPVI és convulxin révén ható kollagén-szerű peptidek szerkezete alapján valószínűnek látszik, hogy a jel erőssége az egybecsoportosuló GPVI/Fc $\gamma$ -komplexek számával kapcsolatos. Más, ebbe az Ig-családba tartozó vérlemezke-receptorok közé tartozik az ICAM-2 (CD-102) és PECAM (CD31).

Az összes, leírásban említett és az igényelt találmánnyal nem közvetlenül kapcsolatos mikroorganizmus, sejtvonal, expressziós rendszer, expressziós gazda, plazmid, promóter, rezisztencia-marker, replikációs origó, restriktív hely vagy egyéb fragmens vagy vektorrész kereskedelmi forgalomban kapható vagy más módon általánosan hozzáférhe-



tó. Amennyiben más útmutatást nem adunk, azokat csak példaként alkalmazzuk, és nem lényegesek a találmány szempontjából, és helyettesíthetők más megfelelő eszközökkel és biológiai anyagokkal.

A találmány szerint lényeges módszereket részletesen feltárjuk alább és fent. Egyéb módszerek, amelyeket nem tárunk fel részletesen, a szakember számára jól ismert szokásos eljárásoknak felelnek meg, vagy részletesebben fel vannak tárva az idézett hivatkozásokban és szabadalmi bejelentésekben, és a szokásos szakirodalomban [például Sambrook és mtsai., „Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2. kiadás, kiad.: Cold Spring Harbor (1989); [Harlow és Lane, „Antibodies: A Laboratory Manual”, kiad.: Cold Spring Harbor (1988)].

1. példa: *Anyagok*

A Protein-A-Sepharose, peroxidázzal konjugált kecske anti-egér és anti-nyúl ellenanyagok, marhaszérum-albumin, *Crotalus durissus terrificus* méreg, búzacsíra-agglutinin (WGA), N-hidroxiszukcinimidil-cloroformáttal aktivált, kereszt kötött 4%-os agaróz-gyöngy és Triton X-114 a Sigma Chemicals Co.-tól (St. Louis, MO) származott, az oktanoil-N-metil-glukamid (ONMG) és nonanoil-N-metil-glukamid (NNMG) az OxyL Chemie-től (Bobingen, Germany) származott.

2. példa: *GPVI izolálása vérlemezkékből*

A membrán-glikoproteineket korábbi leírások szerint izoláltuk vérlemezkékből. Röviden, a vérlemezkéket (40 felhártyából, „buffy coat”) mostuk, és 2% Triton X-114-gyel lizáltuk proteáz-inhibitorok jelenlétében. A Triton X-114



és vizes fázist elválasztottuk, és a detergens-fázist *Sepharose 4B*-hez kötött búzacsíra-agglutininnel (WGA) töltött oszlopra vittük fel. A vérlemezke-glikoproteineket 10 mM Tris HCl, pH 7,4, 30 mM NaCl, 0,2% oktanoil-N-glukanamid (ONMG) és 2% N-acetilglükózamin pufferrel eluáltuk. Dialízis és töményítés után a glikoproteinek oldatát N-hidroxiszukcinimidil-cloroformáttal aktivált, keresztkötött 4%-os agaróz-gyöngyre kötött convulxinnel töltött oszlopra vittük fel (1 mg/ml). Az oszlopot 4 térfogatnyi 10 mM Tris HCl, pH 7,4, 30 mM NaCl, 0,2% nonanoil-N-glukanamid (NNMG) pufferrel mostuk, majd 4 térfogatnyi 10 mM Tris HCl, pH 7,4, 30 mM NaCl, 2% NNMG pufferrel. A GPVI-t 0,08% SDS-t tartalmazó 10 mM Tris HCl, pH 7,4, pufferrel eluáltuk. Az oldatot töményítettük, és 8,5%-os preparatív poliakrialmid-gélre vittük fel (*Model 491 Prep Cell*, BioRad, CA). Preparatív elektroforézist hajtottunk végre nem redukáló körülmények között a gyártó utasításait követve. A GPVI-t egyetlen 65 kDa-os csíkként eluáltuk. A frakciókat összeöntöttük, töményítettük *Centricon-30* (Amicon, Beverly, MA) eszközzel, és újra-felszuszpendáltuk 10 mM Tris HCl, pH 7,4, 0,2% NNMG pufferrel.

### 3. példa: GPVI aminosav-elemzése

A GPVI-t LysC- és AspN-endoproteinázzal (Boehringer Mannheim, Germany) emésztettük. A kapott 10 peptidet fordított fázisú HPLC-vel választottuk el, és *Applied Biosystem 477A* pulzáló-folyadékfázisú fehérje-szekvenátorral szekvenáltuk *model 120A*-as online fenitiohidantoin aminosav-elemzővel.



4. példa: *Egy 221 bázispár hosszúságú, GPVI egy részét kódoló fragmens amplifikálása *lgt11* cDNS-könyvtárból*

Emberi csontvelő-könyvtárból (Clonetech, Palo Alto, CA) származó mintát ( $10^{10}$  pfu, tarfolt alkotó egység, „plaque forming unit”) amplifikáltunk 4 degenerált láncindító 2 kombinációjával. A láncindítók végkoncentrációja  $2 \mu\text{M}$ , a dNTP koncentráció  $200 \mu\text{M}$  volt, és  $2 \text{ U}/100 \mu\text{l}$  *Amplitaq Gold* polimerázt (Perkin elmer, Rotkreuz, Switzerland) alkalmaztunk. A PCR körülményei az alábbiak voltak: 5 ciklus  $37^\circ\text{C}$ -on, majd 30 ciklus  $44^\circ\text{C}$ -on. A szensz 5' TYATHCCNGCNATGAARMG 3' 19-mer láncindítóval és az antiszensz 5' TTRTANARNGCRAAYTGRTC 3' 20-mer láncindítóval egy 221 bázispár hosszúságú fragmenst amplifikáltunk, amelyet *Bluescript KS<sup>+</sup>* (Stratagene, La Jolla, CA) plazmidba szubklónoztuk, és *T7 Sequenase kit*-tel (Amersham, Switzerland) szekvenáltuk.

5. példa: **lgt11* cDNS-könyvtár szkrínelése a 221 bázispár hosszúságú GPVI-próbával*

A 221 bázispár hosszúságú fragmenst kivágtuk a plazmidból, megtisztítottuk,  $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP-vel jelöltük ( $20 \text{ MBq}/50 \mu\text{l}$ , Hartmann Analytik, Braunschweig, Germany) a *High Prime labelling kit* (Boehringer Mannheim, Switzerland) alkalmazásával. Az emberi csontvelő-könyvtárat a gyártó utasításainak követésével szkríneltük. A pozitív fágokat tenyésztettük, a DNS-üket izoláltuk, és *BlueScript*-be szubklónoztuk akár *Eco RI*, akár *Sal I* restrikciós helyek alkalmazásával, és szekvenáltuk. A szekvenálást az *ABS*-rendszerrel végeztük. A *RACE* vérlemezke poliA-RNS-t korábban leírt módon



[Power és mtsai., Cytokine 7, 479-482. old. (1995)] állítottuk elő. A reverz transzkripciót (30 µl) 5 µg poliA-RNS alkalmazásával végeztük az 5' TGAATGAGACGGTCAGTTCAGC 3' láncindítóval (20 µM), dNTP-vel (1 mM), RNazinnal (40 U), 1x AMV-pufferrel és 20 U AMV reverz transzkriptázzal, 20 percen keresztül 45°C-on, majd 20 percen keresztül 52°C-on. A reakcióelegyet 2 µl 6N NaOH-val kezeltük 65°C-on 30 perig, 2 µl 6N ecetsavval semlegesítettük, és Centricon-30 (Amicon) eszközzel töményítettük. A horgonyszekvenciát hozzáligáltuk az első DNS-szálhoz Aptes és Siebert [BioTechniques 15, 890-893. old. (1993)] protokollja követésével. Egymásba ágyazott PCR-t hajtottunk végre a horgonyszekvenciával komplementer láncindító és az 5' TTGTACAGAGCAAATTGGTC 3' (35 cklus, 55°C), majd az 5' GACCAGAGGCTTCCGTTCTG 3' láncindító (30 cklus, 53°C) alkalmazásával. A legmagasabb fragmenst (350 bp) elválasztottuk agaróz-gélelektroforézissel az alacsonyabban lévőktől, BlueScript-be szubklónoztuk, és szekvenáltuk.

#### 6. példa: Anti-GPVI Fab és F(ab')<sub>2</sub> előállítása

Emberi GPVI elleni poliklonális antiszérumokat készítettünk nyulakban. Az anti-GPVI antiszérumból IgG-t tisztítottunk leírt módon. Az IgG immobilizált papainnal (Pierce) történő emésztését Fab-fragmensek előállítására a szállító szokásos protokollja szerint végeztük. Az Fab-fragmenseket immobilizált Protein A oszlopon (Sigma) választottuk el az emésztetlen IgG-től és Fc-fragmensektől. Az átfolyót dializiscsőbe vittük át, szilárd polietilén-glikol 20000-rel betöményítettük, alaposan dializáltuk 20 mM Hepes, 140 mM



NaCl, 4 mM KCl, pH 7,4 pufferrel szemben, és 4°C-on tároltuk felhasználásig. Az F(ab')<sub>2</sub>-fragmenseket IgG peszines emésztésével állítottuk elő, 1:50 enzim:szubsztrát arány (w/w) mellett, 0,5 M acetát, pH 4,0 pufferben, 37°C-on 18 órán keresztül. A pH-t 7,4-re állítottuk át hígított NaOH-val, és a mintát 20 mM foszfát, pH 7,4 pufferrel szemben dializáltuk. Az Fab-fragmenseket immobilizált Protein A kromatográfiával választottuk el az emésztetlen IgG-től és Fc-fragmensektől. Az átfolyót dializiscsőbe vittük át, szilárd polietilén-glikol 20000-rel betöményítettük, intenzíven dializáltuk 20 mM Hepes, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, pH 7,4 pufferrel szemben, és -20°C-on tároltuk alikvotokban. Mossott vérlemezkéket Triton X-114-gyel lizáltunk, és fázisválasztást hajtottunk végre az oldható anyagon, mielőtt a Triton X-114-fázisban található membrán-glikoproteinek *Sepharose 4B*-hez kötött búzacsíra-agglutinines (WGA) affinitási kromatográfiával izoláltuk, mint ahogyan korábban leírtuk. Mivel a GPVI a vérlemezke membrán-glikoproteinjeinek nagyon kicsi részét képezi, a kígyóból származó C-típusú lektin, a convulxin specifitását alkalmaztuk a receptor izolálására. A *Sepharose 4B*-hez kötött convulxinon történő affinitási kromatográfia fő terméként egy 65 kDa-os fehérjét eredményezett. Azonban mind magasabb, mind alacsonyabb molekulatömegű, nem jellemzett anyag is együtt eluálódott a GPVI-vel, és nem volt eltávolítható az oszlop alapos mosásával sem. A tisztítás végső lépéseként preparatív gélelektroforézist alkalmaztunk 8,5%-os poliakrilamid-gélen. A GPVI-t tartalmazó frakciókat összeöntöttük, és egyetlen



csíkot adtak az újraelemzés során. A tisztított GPVI-t teszteltük a vérlemezkék kollagén általi aggregációját gátló képességére. Enyhe gátló hatást figyeltünk meg, amikor a GPVI-oldat alikvotjait hozzáadtuk a vérlemezke-szuszpenzióhoz. Azonban a GPVI kollagénnel történő előinkubációjával - a vérlemezke-szuszpenzióhoz való hozzáadást megelőzően - dóziszfüggő módon gátolhattuk az aggregációt. Ezen vérlemezkék még mindig aggregálódtak, amikor friss kollagént adtunk hozzájuk. Nem redukáló körülmények között az izolált fehérje molekulatömege 62 kDa, enyhe elmozdulással magasabb molekulatömeg (65 kDa) felé redukáló körülmények között. Mivel a GPVI amino-terminálisáról azt találtuk, hogy blokkolt, a fehérjét LysC és LysC/AspN enzimekkel emésztettük, amelyek sorrendben 4 és 6 peptidet eredményeztek, amelyekből szekvenciát nyertünk. A peptideket C4-oszlopon fordított fázisú HPLC-vel elválasztottuk, és Edman-eljárással szekvenáltuk. Ezen peptidek aminosav-szekvenciáját aláhúztuk a transzlált cDNS-szekvenciában (1. ábra).



## Szabadalmi igénypontok

1. DNS, amely Glikoprotein-VI-ot vagy annak biológiai-  
lag aktív fragmensét kódolja.

2. Az 1. igénypont szerinti DNS, amely a 2. ábra szek-  
venciáját részben vagy egészében tartalmazza.

3. DNS, amelynek szekvenciája a 2. ábrán bemutatott  
szekvenciával azonos.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti DNS, amely  
az 1a és 1b ábra aminosav-szekvenciáját tartalmazó Gliko-  
protein-VI-ot kódol.

5. Rekombináns emberi Glikoprotein-VI mint gyógyszer,  
amely az 1b ábra aminosav-szekvenciáját tartalmazza.

6. Gyógyászati készítmény, amely az 5. igénypont sze-  
rinti fehérjét és annak gyógyászatilag elfogadható oldó-  
szerét, hordozóját vagy kötőanyagát tartalmazza.

7. Gyógyászati készítmény, amely gyógyászati hatóanya-  
got is tartalmaz.

8. Rekombináns GPVI alkalmazása vérlemezke-kollagén  
kölcsönhatás specifikus inhibitorainak detektálására szol-  
gáló szkrínelő eszközben.

9. Rekombináns GPVI alkalmazása vérlemezke-kollagén  
kölcsönhatásokkal kapcsolatos trombotikus és kardiovaszku-  
láris események és rendellenességek terápiás területén al-  
kalmazható gyógyszer gyártásában.



10. GPVI szintjében beálló változások alkalmazása vérlemezkek korának, és vérlemezkek trombotikus és kardiovaszkuláris állapotoknak vagy eseményeknek való kitettségének markerként.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Lengyel Zsolt

szabadalmi ügyvivőjelölt

25 oldal  
Zsolt oldal  
-----  
27 oldal  
Bécsi



(1a)

1 20

MSPSP TALFC LGLCLGRVPA

(1b)

1

QSGPLPKPSL QALPSSLVPL EKPVT LRCQG PPGVDLYRLE KLSSRYQDQ (50)

AVLFIPAMKR SLAGRYRCSY QN\*GSLWSLPS DQLELVATGV FAKPSLSAQP (100)

GPAVSSGGDV TLQCQTRYGF DQFALYKEGD PAPYKNPERW YRASFPITV (150)

TAAHSGTYRC YSFSSRDPYL WSAPSDPLEL VVTGTSVTPS RLPTEPPSSV (200)

AEFSEATAEL TVSFTNKVFT TETSR SITTS PKESDSPAGP ARQYYTKGNL (250)

VRICLGAVIL IILAGFLAED WHSRRKRLRH RGRAVQRPLP PLPPLPQTRK (300)

SHGGQDGGRQ DVHSRGLCS (319)

1. ábra



## PCT/EP00/03683

GAGCTCAGGA CAGGGCTGAG GAACCATGTC TCCATCCCCG ACCGCCCTCT (50)  
TCTGTCTTGG GCTGTGTCTG GGGCGTGTGC CAGCGCAGAG TGGACCGCTC (100)  
CCCAAGCCCT CCCTCCAGGC TCTGCCCAGC TCCCTGGTGC CCCTGGAGAA  
GCCAGTGACC CTCCGGTGCC AGGGACCTCC GGGCGTGGAC CTGTACCGCC (200)  
TGGAGAAGCT GAGTTCCAGC AGGTACCAGG ATCAGGCAGT CCTCTTCATC  
CCGGCCATGA AGAGAAGTCT GGCTGGACGC TACCGCTGCT CCTACCAGAA (300)  
CGGAAGCCTC TGGTCCCTGC CCAGCGACCA GCTGGAGCTC GTTGCCACGG  
GAGTTTTTGC CAAACCCTCG CTCTCAGCCC AGCCCGGCCG GCGGGTGTCTG (400)  
TCAGGAGGGG ACGTAACCCT ACAGTGTCTAG ACTCGGTATG GCTTTGACCA  
ATTTGCTCTG TACAAGGAAG GGGACCCTGC GCCCTACAAG AATCCCGAGA (500)  
GATGGTACCG GGCTAGTTTC CCCATCATCA CGGTGACCGC CGCCCACAGC  
GGAACCTACC GATGCTACAG CTTCTCCAGC AGGGACCCAT ACCTGTGGTC (600)  
GGCCCCCAGC GACCCCTGG AGCTTGTGGT CACAGGAACC TCTGTGACCC  
CCAGCCGGTT ACCAACAGAA CCACCTTCCT CGGTAGCAGA ATTCTCAGAA (700)  
GCCACCGCTG AACTGACCGT CTCATTCACA AACAAAGTCT TCACA ACTGA  
GACTTCTAGG AGTATCACCA CCAGTCCAAA GGAGTCAGAC TCTCCAGCTG (800)  
GTCCTGCCCCG CCAGTACTAC ACCAAGGGCA ACCTGGTCCG GATATGCCTC  
GGGGCTGTGA TCCTAATAAT CCTGGCGGGG TTTCTGGCAG AGGACTGGCA (900)  
CAGCCGGAGG AAGCGCCTGC GGCACAGGGG CAGGGCTGTG CAGAGGCCGC  
TTCCGCCCTC GCCGCCCTC CCGCAGACCC GGAAATCACA CGGGGGTCAG (1000)  
GATGGAGGCC GACAGGATGT TCACAGCCGC GGGTTATGTT CATGACCGCT  
GAACCCAGG CACGGTCGTA TCCAAGGGAG GGATCATGGC ATGGGAGGCG (1100)  
ACTCAAAGAC TGGCGTGTGT GGAGCGTGGA AGCAGGAGGG CAGAGGCTAC  
AGCTGTGGAA ACGAGGCCAT GCTGCCTCCT CCTGGTGTTC CATCAGGGAG (1200)  
CCGTTCCGCC AGTGTCTGTC TGTCTGTCTG CCTCTCTGTC TGAGGGCAC (1249)