

P9401989

KÖZZÉTÉTELI
FÉLDÁNY

70291

70291

59.210/SZE

K I V O N A T

Humán Kunitz-típusú proteázgátló és változatai

NOVO NORDISK A/S, BAGSVAERD, DÁNIA

A bejelentés napja: 1993. 01. 07.

Elsőbbsége: 1992. 01. 07. PCT/DK92/00003

DÁNIA

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/DK93/00006

A nemzetközi közzététel száma: WO 93/14123

A találmány tárgya humán, Kunitz-típusú proteázinhibitor,
melyre jellemző, hogy aminosavszekvenciája:

Leu Pro Asn Val Cys Ala Phe Pro Met Glu Lys Gly Pro Cys Gln Thr
Tyr Met Thr Arg Trp Phe Phe Asn Phe Glu Thr Gly Glu Cys Glu Leu
Phe Ala Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Ser Asn Asn Phe Leu Arg Lys
Glu Lys Cys Glu Lys Phe Cys Lys Phe Thr ~~(SEQ ID No. 1)~~

vagy ennek proteázgátló tulajdonságokkal rendelkező változata.

Handwritten signature and text:
Közzétételre
felkészítve
D. J.

A találmány tárgya új, humán Kunitz-típusú proteázgátló és változatai; az inhibítort és változatait kódoló DNS; eljárás az új inhibítor és változatainak előállítására; és gyógyszerkészítmények, melyek az új inhibítort vagy változatait tartalmazzák.

A polimorfmagvú leukociták (neutrofilek vagy PMN-ek) és a mononukleális fagociták (monociták) fontos szerepet töltenek be a szövetkárosodásnál, fertőzésnél, akut vagy krónikus gyulladásnál és a sebhegedésnél. A sejtek a vérből a gyulladás helyéhez vándorolnak és - a megfelelő stimulációt követve - oxidánsokat ($O\cdot$, O_2^- , H_2O_2 és $HOCl$), valamint különféle proteolitikus enzimeket tartalmazó szemcséket hoznak létre. A kiválasztó szemcsék többek között alkalikus foszfatázt, metaloproteinázokat - például zselatinázt és kollagenázt - és szerin-proteázokat - például neutrofil elasztázt, katepszin G-t és proteináz 3-t tartalmaznak.

Látens metaloproteinázok szabadulnak fel metaloproteináz szöveti gátlóval (TIMP) együtt. Az aktivációs mechanizmus nem teljesen felderített, de valószínű, hogy tiolcsoportok oxidációja és/vagy a proteolízis szerepet játszik a folyamatban. A szabad metaloproteináz-aktivitás a TIMP inaktivációtól is függ.

A leukociták azurofil szemcséiben a szerin-proteázok - neutrofil elasztáz, katepszin G és proteináz-3 - aktív enzimként találhatóak glükóz-amino-glükánokkal komplexet alkotva. Ezek a komplexek inaktívak, de a szekréciónál disszociálnak, és felszabadulnak az aktív enzimek. A proteáz aktivitás semlegesítésére nagy mennyiségű α_1 -proteínáz inhibítor (α_1 -PI) és α_1 -kimotripszin inhibítor (α_1 -ChI) található a plazmában. A polimorfmagvú

leukociták viszont képesek helyileg inaktiválni az inhibítorokat. Így a neutrofil elasztáz legfontosabb inhibítora, az α_1 -PI reaktív centruma (Met-358) érzékeny az aktiválódott PMN-ek által termelt metabolitok oxidáló hatására. Ez kb. 2000-szeres mértékben csökkenti az α_1 -PI neutrofil elasztázzal szembeni affinitást.

Az α_1 -PI helyi semlegesítése után az elasztáz más proteolitikus enzimek számos gátlóját képes tönkretenni. Az elasztáz hasítja az α_1 -ChI-t és ezáltal elősegíti a katepszin G aktivitását. Ugyancsak hasítja a TIMP-t, ami a metaloproteinázok általi szöveti degradációt eredményezi. Továbbá az elasztáz hasítja az antitrombin III-t és a heparin kofaktor II-t, valamint a "szöveti faktor folyamat" gátlót (Tissue factor pathway inhibitor, TFPI), ami valószínűleg elősegíti a rögzépződést. Másrészt a neutrofil elasztáz koagulációs faktorokat lebontó képessége feltételezhetően ellentétes hatású, úgyhogy az elasztáz teljes hatása nem világos. A neutrofil elasztáz fibrinolízisre gyakorolt hatása egyértelműbb. A fibrinolitikus aktivitás fokozódik, amikor az elasztáz hasítja a plazminogén aktivátor-gátlót és az α_2 plazmin-inhibítort. Ezenkívül, ezen mindkét inhibítort oxidálják és inaktiválják az O_2 -metabolitok.

A PMN-ek nagy mennyiségű szerin-proteázt tartalmaznak, és az egyes leukocita proteázokból 200 mg szabadul fel naponta, hogy leküzdjék a szervezetbe behatoló ágenseket. Akut gyulladásokkor a felszabaduló enzim mennyisége többszörösére növekszik. Normális körülmények között az α_1 -PI, α_1 -ChI és az α_1 makroglobulin gátlók

nagy mennyisége kellően alacsony szinten tartja a proteolízist. Több jel azonban arra mutat, hogy számos krónikus betegséget patológiás proteolízis okoz, ami a PMN-ek túlstimuláltságának következménye. Ezt eredményezi például az autoimmun válasz, a krónikus fertőzés, a dohányfüst vagy más irritáló tényező, stb.

Az aprotinin (borjú hasnyálmirigy-tripszin inhibitor) ismert gátlója a különféle proteázoknak, ideértve a tripszint, kimotripsint, plazmint és kallikreint, ezért terápiás céllal alkalmazzák az akut hasnyálmirigy-gyulladás, a sokk-szindróma különböző állapotai, hiperfibrinolitikus vérzés és miokardiális infarktus kezelésére [például J. E. Trapnell és munkatársai, Brit. J. Surg., 61:177 (1974); J. McMichan és munkatársai, Circulatory shock, 9:107 (1982); L. M. Auer és munkatársai, Acta Neurochir., 49:207 (1979); G. Sher, Am. J. Obstet. Gynecol., 129:164 (1977); és B. Schneider, Arzneim.-Forsch., 26:1606 (1976)]. Az aprotinin nagy dózisú adagolásával lényegesen csökkenthető a szívműtéteknél - beleértve a kardio-pulmonáris sönt kialakítását - jelentkező vérvesztés [például B.P. Bidstrup és munkatársai, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 97:364-372 (1989); W. van Oeveren és munkatársai, Ann. Thorac. Surg., 44:640-645 (1987)]. Megelőzőleg kimutatták [például H. R. Wenzel és H. Tschesche, Angew. Chem. Internat. Ed., 20: 295 (1981)], hogy bizonyos aprotinin analógok, például az aprotinin (1-58, Val15) viszonylag magas szelektivitást mutatnak a granulocita-elasztázttal szemben és gátló hatást a kollagenázra, míg az aprotinin (3-58, Arg15, Ala17, Ser42) kiváló plazmakallikreint gátló hatással rendelkezik (lásd; WO 89/10374).

Viszonylag magas aprotinin dózisok ismételt injektálásánál vesekárosító hatást figyeltek meg patkányoknál, nyulaknál és kutyáknál (Bayer, Trasylol, Inhibitor of proteainase; E. Glaser és munkatársai, in: "Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 78. Kongress", Bergmann, München 1972, 1612-1614. old.). Az aprotinin nefrotoxikus hatása (többek között elváltozásokként jelenik meg) a hatóanyagnak a vese proximális tubulus-sejtjeiben való felhalmozódásával magyarázható, ami az aprotinin magas pozitív töltésének az eredménye, minthogy megkötődik a tubulusok negatív töltésű felületén. Ez a nefrotoxicitás az aprotinint klinikai felhasználásra kevésbé alkalmassá teszi különösen ott, ahol az inhibítor nagy dózisban történő adagolására van szükség (például a kardiopulmonális sönt kialakításánál). Emellett az aprotinin egy borjúprotein, ami ezért egy vagy több epitopot tartalmazhat, ami nemkívánatos immunválaszt vált ki az embernél.

A jelen találmány tehát olyan humán proteínázinhibitorokkal foglalkozik, melyek aprotinin típusúak (azaz Kunitz-típusú inhibitorok), hasonló gátlási profillal, illetve ezek olyan módosulataival, melyek a kívánt gátlási profillal rendelkeznek.

A találmány tárgya új humán, Kunitz-típusú proteázgátló, melynek aminosavszekvenciája:

Asp Leu Leu Pro Asn Val Cys Ala Phe Pro Met Glu Lys Gly Pro Cys
Gln Thr Tyr Met Thr Arg Trp Phe Phe Asn Phe Glu Thr Gly Glu Cys
Glu Leu Phe Ala Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Ser Asn Asn Phe Leu
Arg Lys Glu Lys Cys Glu Lys Phe Cys Lys Phe Thr (SEQ ID No.1)

vagy ennek proteázgátló tulajdonságokkal rendelkező változata.

A találmány további tárgya humán, Kunitz-típusú proteázinhibítor változata, melynek aminosavszekvenciája:

X¹ Asn Val Cys Ala Phe Pro Met Gu X² Gly X³ Gys X⁴ X⁵ X⁶ X⁷ X⁸
 X⁹ Trp Phe Phe Asn Phe Glu Thr Gly Glu Cys Glu Leu Phe X¹⁰ Tyr
 Gly Gly Cys X¹¹ X¹² X¹³ Ser Asn Asn Phe X¹⁴ X¹⁵ X¹⁶ Glu Lys Cys
 Glu Lys Phe Cys Lys Phe X¹⁷ (SEQ ID No. 2),

ahol X¹ jelentése hidrogénatom vagy 1-5 természetes aminosavrész, kivéve a Cys-t, X²-X¹⁶ jelentése egymástól függetlenül egy természetes aminosavrész, kivéve a Cyst és X¹⁷ jelentése hidroxilcsoport vagy 1-5 természetes aminosavrész, kivéve a Cys-t, azzal a feltétellel, hogy az X¹-X¹⁷ aminosavrész közül legalább egy különbözik a természetes szekvenciákban lévő megfelelő aminosavrésztől.

A "természetes aminosavrész" kifejezésen a 20 általánosan előforduló aminosav - azaz az Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg és His - egyikét értjük. Az új inhibítor DNS szekvenciáját a humán genomiális DNS könyvtárból izoláljuk a homológiát felhasználó polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával. Az ismert humán, Kunitz-típusú proteázinhibítor doménjének aminosavszekvenciáját az aprotininével összevetve két régiót - az I és II - azonosítottunk, ami megfelel az aprotinin aminosavszekvencia 12-16., illetve 35-38 aminosavainak. Regenerált PCR primereket terveztünk, amelyek megfeleltek az I, illetve II homológ régióknak. A PCR primerek az 5' végükön egy restriktációs hasítóhelyet tar-

talmaznak, ami a klónozás szempontjából fontos, Két primert alkalmazó PCR reakciókkal olyan DNS szekvenciát azonosítottunk, ami megfelel az új Kunitz-típusú proteázinhibítor doménnek. Ezt a DNS szekvenciát használjuk fel próbaként a teljes hosszúságú DNS szekvencia izolálására a humán genomiális kozmid könyvtár szűrővizsgálatainál. Az izolációs eljárást részletesen az 1. példában ismertetjük, az 1. és 2. ábra segítségével. A továbbiakban az új inhibítort HKIB9 elnevezéssel szerepeltetjük.

Egy vagy több aminosavnak a fentebb említett helyeken történő helyettesítésével lehetőség nyílik a HKIB9 gátlási profiljának a megváltoztatására oly módon, hogy az elsődlegesen gátolja a neutrofil elasztázt, a katepszin G-t és/vagy a proteínáz-3-t. Továbbá lehetőség van olyan változatok elkészítésére, melyek specifikusan gátolják a koagulációban vagy fibrinolízisben (például plazmin vagy plazma-kallikrein), illetve a komplement kaszkádban résztvevő enzimeket.

A HKIB9-nek egyik előnye, hogy az ösztöltése nulla, ellentétben az aprotininével, mely - mint fentebb jeleztük - erős pozitív töltésű. Olyan találmány szerinti változatokat készíthetünk tehát el, melyeknek töltésösszege az aprotinin töltésénél kevésbé pozitív, és így e változatok nagy dózisban való adagolásánál csökken a vesekárosodás esélye. A másik előnye az aprotininhez képest, hogy ez humán fehérje (fragmens), így tehát az emberi szervezetbe való bevitelénél a nemkívánatos immunkreakciók lényegesen lecsökkennek.

A HKIB9 előnyös variánsai közül példaként említjük azt,

ahol X^1 jelentése Asp-Leu-Leo-Pro; vagy ahol X^2 jelentése Ala, Arg, Thr, Asp, Pro, Glu, Lys, Gln, Ser, Ile vagy Val, különösen, ahol X^2 jelentése Thr vagy Lys; vagy ahol X^3 jelentése Pro, Thr, Leu, Arg, Val vagy Ile, különösen, ahol X^3 jelentése Pro vagy Ile; vagy ahol X^4 jelentése Lys, Arg, Val, Thr, Ile, Leu, Phe, Gly, Ser, Met, Trp, Tyr, Gln, Asn vagy Ala, különösen, ahol X^4 jelentése Lys, Val, Leu, Ile, Thr, Met, Gln vagy Arg; vagy ahol X^5 jelentése Ala, Gly, Thr, Arg, Phe, Gln vagy Asp, különösen, ahol X^5 jelentése Ala, Thr, Asp vagy Gly; vagy ahol X^6 jelentése Arg, Ala, Lys, Leu, Gly, His, Ser, Asp, Gln, Glu, Val, Thr, Tyr, Phe, Asn, Ile vagy Met, különösen, ahol X^6 jelentése Arg, Phe, Ala, Leu vagy Tyr; vagy ahol X^7 jelentése Ile, Met, Gln, Glu, Thr, Leu, Val vagy Phe, különösen, ahol X^7 jelentése Ile; vagy, ahol X^8 jelentése Ile, Thr, Leu, Asn, Lys, Ser, Gln, Glu, Arg, Pro vagy Phe, különösen, ahol X^8 jelentése Ile vagy Thr; vagy ahol X^9 jelentése Arg, Ser, Ala, Gln, Lys vagy Leu, különösen ahol X^9 jelentése Arg; vagy ahol X^{10} jelentése Gln, Pro, Phe, Ile, Lys, Trp, Ala, Thr, Leu, Ser, Tyr, His, Asp, Met, Arg vagy Val, különösen, ahol X^{10} jelentése Val vagy Ala; vagy ahol X^{11} jelentése Gly, Met, Gln, Glu, Leu, Arg, Lys, Pro vagy Asn, különösen, ahol X^{11} jelentése Arg vagy Gly; vagy ahol X^{12} jelentése Ala vagy Gly; vagy ahol X^{13} jelentése Lys, Asn vagy Asp, különösen, ahol X^{13} jelentése Lys vagy Asn; vagy ahol X^{14} jelentése Val, Tyr, Asp, Glu, Thr, Gly, Leu, Ser, Ile, Gln, His, Asn, Pro, Phe, Met, Ala, Arg, Trp vagy Lys, különösen, ahol X^{14} jelentése Lys vagy Leu; vagy ahol X^{15} jelentése Arg, Ser vagy

Thr; vagy ahol X^{16} jelentése Glu, Lys, Gln vagy Ala, különösen ahol X^{16} jelentése Lys vagy Ala; vagy ahol X^{17} jelentése Thr.

Előnyös kivitelezési módnál X^1 jelentése Asp-Leu-Leu-Pro, X^{17} jelentése Thr és X^2 - X^{16} jelentései a fentiekben tett meghatározásokkal azonos.

A találmány szerinti HKIB9 variánsok előnyösen nem tartalmaznak Met-t a proteázköthő régióban (vagyis az X^3 - X^{14} aminosavak által reprezentált szakaszban). Az α_1 -PÉI fent leírt analógiájára, e helyek bármelyikén lévő Met maradék az inhibítort érzékennyé tenné a PMN-ek által termelt oxigén-metabolitok oxidatív inaktiváló hatásával szemben és fordítva, ha e helyeken nem szerepel Met maradék, az az inhibítornak nagyobb stabilitást biztosít az oxigén-metabolitok jelenlétében.

A találmány szerinti előnyös variáns általában az, ahol a Kunitz-típusú inhibítor proteázköthő-helyén (azaz az X^4 - X^{14} aminosavak által reprezentált helyeken, ami az aprotininnél megfelel a 13., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 34., 39., 40., 41. és 46. helyeknek) azok az aminosavak szerepelnek, mint a természetes aprotinin ugyanazon helyein. Ez a változat az alábbi aminosavszekvenciát tartalmazza:

Asp Leu Leu Pro Asn Val Cys Ala Phe Pro Met Glu Lys Gly Pro Cys
Lys Ala Arg Ile Ile Arg Trp Phe Phe Asn Phe Glu Thr Gly Glu Cys
Glu Leu Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Ser Asn Asn Phe Lys
Ser Lys Glu Lys Cys Glu Lys Phe Cys Lys Phe Thr (SEQ ID No. 3).

A találmány további tárgya, DNS szerkezet, ami Kunitz-típusú inhibítort vagy annak találmány szerinti változatát kódolja. A

találmány szerinti DNS szintetikus úton a szokásos módszerekkel előállítható, például S. L. Beaucage és M. H. Caruthers által leírt foszfoamidit módszerrel [Tetrahedron Letters, 22:1859-1869 (1981)] vagy Matthes és munkatársai módszerével [EMBO Journal, 3:801-805 (1984)]. A foszfoamidit módszer szerint oligonukleotidokat szintetizálunk, azokat tisztítjuk, hasítjuk, ligáljuk és megfelelő vektorokban klónozzuk.

Alternatív módon használhatunk genomiális vagy cDNS-t is a HKIB9 kódolásához (azaz, amit a genom könyvtár szűrővizsgálatával kapunk a fentebb leírtak szerint). A DNS szekvencia módosítható egy vagy több olyan helyen, ahol a kívánt aminosavcserét akarjuk elvégezni, például hely-irányította mutagenézissel, amihez a homológ rekombináció jól ismert eljárásában a kívánt aminosavszekvenciát kódoló szintetikus oligonukleotidokat használjuk.

A találmány további tárgya, a találmány szerinti DNS szerkezetet tartalmazó rekombináns expressziós vektor. A rekombináns expressziós vektor lehet bármilyen vektor, ami előnyösen alávethető rekombináns DNS eljárásoknak. A vektor kiválasztása gyakran a gazdasejt függvénye. Így a vektor lehet önállóan sokszorozódó vektor, azaz amelyik extrakromoszómálisan, elkülönülten létezik, replikációja független a kromoszómális replikációtól; ilyen például a plazmid. Másrészt a vektor lehet olyan is, hogy a gazdasejtbe való bevitel után beépül a gazdasejt genomjába és a kromoszómá(k)val replikálódik, amelybe beépült. A vektorban a HKIB9-t vagy annak változatát kódoló DNS

szekvenciának működő kapcsolatban kell legyen egy alkalmas promoter szekvenciával. A promoter bármilyen olyan DNS szekvencia lehet, ami a kiválasztott gazdasejtben transzkripció aktivitást mutat, és származhat homológ vagy heterológ fehérjét kódoló génekből. Így például emlős sejtekben az inhibítort kódoló DNS transzkripciójának irányítására alkalmas az SV promoter [Subramani és munkatársai, Mol. Cell. Biol., 1:854-864 (1981)], az MT-1 (metalotionein) promoter [Palmiter és munkatársai, Science, 222:809-814 (1983)] vagy az adenovírus 2 major késői promoter. Élesztő gazdasejtekben alkalmazható promoterek lehetnek az élesztő glikolitikus génjeiből [Hitzeman és munkatársai, J. Biol. Chem., 255:12073-12080 (1980); Alber és Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen., 1:419-434 (1982)], az alkohol-dehidrogenáz génekből [Young és munkatársai; in: Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals, szerk.: Hollaender és munkatársai, Plenum Press, New York, 1982) származó promoterek vagy a TPI 1 (4 599 311 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom) vagy ADH2-4c [Russel és munkatársai, Nature 304:652-654 (1983)] promoterek. Amennyiben a gazdasejt fonalgomba, alkalmas promoter lehet az ADH3 promoter [McKnight és munkatársai, The EMBO J., 4:2093-2099 (1985)] vagy a tpiA promoter.

A találmány szerinti inhibítort kódoló DNS szekvenciának egy alkalmas terminátorhoz is működőképesen kell kapcsolódnia. Ilyen terminátor lehet a humán növekedési hormon terminátora (Palmiter és munkatársai, lásd fent) vagy - ha a gazdasejt gomba - a TPI1 (Alber és Kawasaki, lásd fent) vagy az ADH3 (McKnight és munka-

társai, lásd fent) promoterek. A vektor további elemeket is tartalmazhat, például poliadenilációs szignált (például az SV40-ből vagy az adenovírus 5' Elb régiójából), transzkripciós enhancer szekvenciát (például SV40 enhancer) és transzlációs enhancer szekvenciát (például VA adenovírus RNS-t kódoló).

A találmány szerinti rekombináns expressziós vektor tartalmazhat még olyan DNS szekvenciát, ami lehetővé teszi a vektor számára, hogy az adott gazdasejtben replikálódjon. Ilyen szekvenciára példa - ha a gazdasejt emlőssejt - az SV40 replikációs origója vagy - ha a gazdasejt élesztősejt - a 2 μ -os élesztőplazmid REP 1-3 replikációs gének vagy replikációs origó. A vektor tartalmazhat szelektációs markert, például olyan gént, aminek terméket kiegészíti a hiányos gazdasejtet, ilyen lehet a dihidrofolát-reduktázt (DHFR) kódoló gén; vagy amelyik rezisztenciát biztosít egy adott hatóanyaggal, például neomicinnel, higromicinnel vagy metotrexáttal szemben; vagy a *Schizosaccharomyces pombe* TPJ gént [P. R. Russel, *Gene*, 40:125-130, (1985)].

Az eljárás, mellyel a találmány szerinti inhibítort kódoló DNS szekvenciát, a promotert, illetve a terminátort ligáljuk és a replikációs információkat tartalmazó alkalmas vektorba beépítjük; jól ismert a szakemberek előtt (lásd például: Sambrook és munkatársai, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

A gazdasejt, amelybe a találmány szerinti expressziós vektort bevisszük, bármilyen sejt lehet, ami a találmány szerinti inhibítort termelni képes, ez előnyösen egy eukarióta sejt,

például emlős-, élesztő- vagy gombasejt.

A gazdasejtként alkalmazható élesztősejt bármilyen olyan élesztőgomba lehet, ami a tenyésztése alatt nagy mennyiségű találmány szerinti inhibítort termel. Példaként említhető alkalmas élesztőgombák a *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe* vagy a *Saccharomyces uvarum* törzsei. Az élesztősejt transzformálása történhet protoplaszt-képzéssel, amit természetesen az ismert módon végzett transzformáció követ.

Alkalmas emlős sejtvonalakra példaként említjük a COS (ATCC CRL 1650), a BHK (ATCC CRL 1632, ATCC CCL 10) vagy a CHO (ATCC CCL 61) sejtvonalakat. Az emlőssejtek transzfektálására és a sejtekbe bevitt DNS szekvenciák kifejezésére szolgáló módszereket írják le az alábbi munkák: Kaufman és Sharp, *J. Mol. Bio.*, 159:601-621 (1982); Southern és Berg, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1:327-341 (1982); Loyter és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 79:422-426 (1982); Wigler és munkatársai, *Cell*, 14:725 (1978); Corsaro és Pearson, *Somatic Cell Genetics*, 7:603 (1981); Graham és van der Eb, *Virology*, 52:456 (1973); Neumann és munkatársai, *EMBO J.*, 1:841-845 (1982).

Gazdasejtként alkalmazhatunk gombasejteket is. Alkalmasak a fonalagombák sejtjei, például az *Aspergillus* vagy *Neurospora* fajok, különösen az *Aspergillus oryzae* vagy az *Aspergillus niger* törzsek. *Aspergillus* faj fehérjék kifejezésére való felhasználását írja le például az EP 238023 szabadalom.

A találmány további tárgya, eljárás a találmány szerinti

inhibítor előállítására, mely eljárás a fenti sejtek olyan körülmények között történő tenyésztéséből, mely a találmány szerinti inhibítor kifejeződéséhez vezet, valamint a nyert inhibítor tenyészleiből való kinyeréséből áll.

A sejtek tenyésztéséhez használt tápközeg bármely olyan táptalaj lehet, mely alkalmas az emlőssejtek vagy a gombák (beleértve az élesztőket) tenyésztésére. A gazdasejt az inhibítort kiválasztja a tápközegbe, ahonnan az a szokásos módszerekkel kinyerhető. Ehhez elválasztjuk a sejteket a közegtől centrifugálással vagy szűréssel, a felülúszóból vagy a szűrletből sóval - például ammónium-szulfáttal - lecsapjuk a fehérjeszerű alkotórészeket, majd különféle kromatográfiás eljárással - például ioncserés kromatografálással vagy affinitás-kromatografálással, stb. - tisztítunk.

A találmány további tárgya gyógyszerkészítmény, mely HKI B9-et vagy annak találmány szerinti változatát tartalmazza gyógyászati szempontból alkalmazható vívműanyagok vagy közegül szolgáló anyagok kíséretében. A találmány szerinti készítmény bármely ismert módszerrel formulázható, erre példákat találunk a Reminton's Pharmaceutical Sciences (1985) munkában. A készítmény tipikus formájában alkalmas a szisztémás injekcióra vagy infúzióra és ehhez steril vízben, izotóniás sóoldatban vagy glükózoldatban készült oldatot használunk.

HKIB9 vagy annak találmány szerinti változata tehát előnyösen alkalmazható gyógyászati célra ott, ahol natív aprotinin vagy más gátlási profilú aprotinin analóg javasolt, kü-

lönösen abban az esetben, ha nagy aprotinin dózisok adagolása szükséges. A találmány szerinti változat alkalmazhatósága annak köszönhető, hogy gátolni képes a humán szerin-proteázokat, például a tripszint, plazmint, kallikreint, elasztázt, katepszin G-t, proteínáz-3-at. Olyan betegségek kezelésére alkalmas, ahol feltételezhető, hogy azok oka az aktív PMN-ekből felszabaduló elasztáz, katepszin G és proteínáz-3 által kiváltott patológiás proteolízis. Ide tartozik (de nem korlátozódva csak ezekre) az akut hasnyálmirigy-gyulladás, gyulladások, trombocitopénia, vérlemez-funkció védelem, szervvédelem, sebhegésedés, sokk (beleértve a tüdőszokkot) hiperfibrinolitikus vérzés, emfizéma, reumatoid ízületi gyulladás, felnőttkori légzési nehézségek, krónikus gyulladássos bélártalmak és pikkelysömör.

A fenti gyógyászati alkalmazáson kívül a HKIB9 vagy változata felhasználható olyan természetes anyagok humán eredetű forrásokból való izolálására, melyek közvetlenül vagy közvetve a TFPI Kunitz-típusú domén-II-höz kötődnek. Ezek lehetnek például proteázok vagy receptorok. Az említett tulajdonság felhasználható szűrővizsgálatoknál vagy affinitás kromatográfia alkalmazásakor.

Az elmodottakhoz a szokásos DNS technikát alkalmazzuk (Sambrock J., Fritsch E. F. és Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 1989). A szintetikus oligonukleotidokat automata DNS-szintetizátoron (380B, Applied Biosystems) készítjük el a foszforamidit eljárással, ellenőrzött pórusú üveghor-

dozón [Beaucage S. L. és Caruthers M. H., Tetrahedron Letters, 22:1859-1869 (1981)]. A DNS szekvenciát dideoxi-láncterminációs technikával határozzuk meg [Sanger F., Micklen S. és Coulson A. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467 (1977)]. A polimeráz láncreakciókat (PCR) egy DNS Thermal Cycler készüléken (Perkin Elmer Cetus) hajtjuk végre.

Aminosavanalízishez a vizsgálandó mintát vákuumban leforasztott csövekben 6M sósavban 110°C hőmérsékleten 24 órán keresztül hidrolizáljuk. Az analízist mikrokaliberű művelethez módosított Beckman 121 MB automata aminosavanalizátoron végezzük. Az N-terminális aminosavszekvenciát egy, az Edman lebontást alkalmazó, automata Applied Biosystems 470A gázfázisú szekvenátoron kapjuk meg. Az egyes ciklusokból származó felszabadult PTH-aminosavak detektálását és mennyiségi meghatározását on-line fordított fázisú HPLC-vel hajtjuk végre.

A molekulaszúly meghatározás BIO-ION 20 plazmadeszorpciós tömegspektrométeren (PDMS) történik, ami egy kb. 15 cm-es repítőcsővel van ellátva és pozitív módban működik. 5 µl-es mintákat analizálunk felgyorsuló feszültségtartományál 15 kV-ig és az ionokat 5 millió hasítási eseményből gyűjtjük össze. A molekulaiion meghatározási pontossága jól definiált csúcsnál 0,1 %-os, különben valamivel alacsonyabb.

Az elmondottak szemléltetésére az alábbiakban példákat adunk meg. A példák kizárólag szemléltető célzatúak és a találmány oltalmi körét nem korlátozzák.

1. példa

Humán Kunitz-típusú proteázinhibitor HKIB9 domén klónozása

A) PCR klónozás

A 18 PCR reakció mindegyikénél templátként 1 μ g humán placenta genomiális DNS-t használunk (Clontech, Palo Alto, CA, USA, kat.sz.: 6550-2) 100 pmól "jobb" A, B, C, E, F vagy H primerrel és 100 pmól "bal" X, Y vagy Z primerrel (2. ábra). A PCR reakciókat 100 μ l térfogatban hajtjuk végre kereskedelmi készletet (GeneAmp, PerkinElmer Cetus) használva. A reakcióelegyet 95°C hőmérsékleten melegítjük 4 percen át, majd az alábbi kezelési ciklusnak vetjük alá: 95°C 1 percen át, 50°C 1 percen át és 72°C 1 percen át. 30 ciklus után a befejeződő ciklus 72°C-os lépése 10 percen keresztül tart.

A reakcióelegyet 2 %-os agarózzgelen elektroforizáljuk és a 0,1 kb DNS fragmenseket izoláljuk. Az EcoRI és XbaI emésztés után a pTZ19R plazmid 2,8 kb-ú EcoRI és XbaI fragmenséhez [Pharmacia LKB, Uppsala, Svédország, kódszám: 27-4986-01; Mead D.A., Szczensna-Skorupa E. és Kemper B., Prot. Engin., 1:67-74 (1986)] ligálunk. A ligációs eleggyel kompetens E.coli törzset (r^- , m^+) transzformálunk, és ampicillin rezisztenciára szelektálunk. A nyert telepekből izolált plazmidokat EcoRI és XbaI enzimekkel emésztjük, majd 2 %-os agarózzgelen elektroforizálunk. A plazmidokon DNS szekvenálást végzünk kb. 91 bp inszertekkel.

A humán Kunitz-típusú proteázgátló-doméneket a TG(T/C)NNNNNTT(T/C)NNN jellemző DNS szekvenciával azonosítjuk,

ami megfelel a konstans Cys 30 és Phe 33 (aprotinin számozás, az 1. ábrán csillaggal jelölve) kodonját tartalmazó, az alkalmazott két PCR primertől helyes távolságra lévő régióknak.

Az ismert humán Kunitz-típusú proteázinhibítor-doméneken és az azokkal nem rokon szekvenciákon kívül egy új, a B és Y primereket felhasználó PCR reakcióból származó DNS szekvenciát azonosítottunk, ami megfelel a HKIB9 humán Kunitz-típusú proteáz-inhibítor doménnek. A HKIB9 két PCR primerje közötti DNS szekvencia és a megfelelő aminosavszekvencia a következő.

T Y M T R W F F N F E T G E C E L F A
AACCTACATGACGCGATGGTTTTTCAACTTTGAAACTGGTGAATGTGAGTTATTTGCT

A fentebb említett jellemző DNS szekvencia alá van húzva.

B) Könyvtár szűrővizsgálat

A humán genomiális DNS kozmid könyvtárat az alábbiak szerint állítjuk össze. A humán genomiális DNS-t emberi teljes vérből izoláljuk. A DNS részleges Sau3A emésztése után a pWE15 kozmid vektor (Stratagene, La Jolla, CA, USA) BamHI helyére ligálunk. Kb. 420000 telepet vizsgálunk át a

5' CAAATAACTCACATTCACCAGTTTCAAAGTTGAAAAACCATCGCGTCATGTAGGT 3' szekvenciájú oligonukleotid próba-4280-at használva, mely az 5' végen ³²P-vel jelzett. A szűrőket egy éjszakán át hibridizáljuk 65°C hőmérsékleten 5xSSC, 5xDenhardt 0,1 % SDS reagensekben. Ezután a szűrőt 65°C hőmérsékleten 1 órán át 1xSSC, 0,1 % SDS reagensekben mossuk és filmre exponálunk. A pozitív kozmidokat azonosítjuk, 3,5 kb-ú PstI fragmenseket izolálunk és pUC18 plazmidba szubklónozzuk, a pMb-106 plazmidot nyerve. A pMb-106



DNS szekvenciáját a SEQ ID No.4 mutatja be.

2. példa

HKIB9 humán Kunitz-típusú proteázinhibítor-domén termelése
KFN-1830 élesztőtörzzsel

1 μ g humán placenta genomiális DNS-t (Clontech, Palo Alto, CA, USA, kat. sz.: 6550-2) használunk templátként a PCR reakcióhoz, 100 pmól N-1 primert (CCGTTTCTAGATTAGGTGAACTTGCAGAATTTCTC) és 100 pmól N-2 primert (GCTGAGAGATTGGAGAAGAGAGATCTCCTCCC-AAATGT) alkalmazva. Az N-1 összeillő a 3. ábra HKIB9 genomiális DNS szekvenciájának 346-367. bázisaival, és olyan 5' véget hordoz, ami transzlációs stopkodont tartalmaz, amit egy XbaI hasítóhely követ. Az N-2 3'-terminális 17 bázisa azonos a HKIB9 genomiális DNS szekvenciájának 187-207. bázisaival a SEQ ID No.4-ben, az 5'-terminális 21 bázisa azonos az alábbiakban leírt pKFN-1000 plazmidből származó szintetikus leader szekvencia (SEQ ID No.5) 215-235. bázisaival.

A PCR reakciót 100 μ l térfogatban hajtjuk végre kereskedelmi készletet használva (GeneAmp, Perkin Elmer Cetus) A ciklus: 94°C hőmérsékleten 20 mp, 50°C hőmérsékleten 20 mp és 72°C hőmérsékleten 30 mp. 19 ciklus után a végső ciklus 72°C hőmérsékletű lépése 10 percen keresztül tart. A PCR terméket - egy 215 bp fragmens - 2 %-os agarózlemezen elektroforézissel izoláljuk.

Szignál-leader: a PCR reakcióban 100 pmól NOR-1478 primert (GTAAAACGACGGCCAGT) és 100 pmól NOR-2523 primert

(TCTCTTCTCCAATCTCTCAGC) használunk, és templátként az alábbiakban leírt pKFN-1000 plazmidból származó 0,7 kb PvuII fragmens 0,1 μ g-ját alkalmazzuk. A NOR-1478 a SEQ ID No.6 EcoRI helyétől közvetlenül felfelé elhelyezkedő szekvenciákhoz illeszkedik. A NOR-2523 összeillő a pKFN-1000 szintetikus leader génjének 17 3'-terminális bázisával; lásd: SEQ ID. No.6. A PCR reakciót a fentiekben leírtak szerint hajtjuk végre, 257 bp fragmenst nyerve.

A pKFN-1000 plazmid a pTZ19R plazmid [Mead D.A., Szczesna-Skorupa E. és Kemper B., Prot., Engin., 1:67-74 (1986)] származéka, egy szintetikus élesztő szignál-leader peptidet kódoló DNS-t tartalmaz. A pKFN-1000 plazmidot a WO 90/10075 számú szabadalom írja le.

A pKFN-1000 EcoRI helyétől lefelé elhelyezkedő 235 bp DNS szekvenciáját és a szintetikus élesztő szignál-leader kódolta aminosavszekvenciát a SEQ ID No.6 adja meg.

Szignál-leader-HKIB9: a fentebb leírt két PCR fragmensből 0,1-0,1 μ g-t összekeverük. A PCR reakció elvégzéséhez 100 pmól NOR-1478 primert és 100 pmól N-1 primert használunk a következő ciklus teljesítésével: 94°C 1 percen át, 50°C 2 percen át és 71°C 3 percen át. 16 ciklus után a végső ciklus 72°C hőmérsékletű lépését 10 percen át folytatjuk.

A nyert 451 bp-ú fragmenst elektroforézissel tisztítjuk 1 %-os agarózgélen, majd EcoRI és XbaI enzimekkel hasítjuk. Az így kapott 418 bp-ú fragmenst a pTZ19R plazmidból származó 2,8 kb-ú EcoRI-XbaI fragmenshez ligáljuk. A ligációs keveréket használjuk fel a kompetens E.coli törzs (r^- , m^+) transzformálására,

ampicillin-rezisztenciára szelektálva. A DNS szekvenálás azt mutatja, hogy a kapott telepekből származó plazmidok tartalmazzák a HKIB9 DNS szekvenciáját, helyesen kapcsolódva a szintetikus élesztő szignál-leader génhez. Egy pKFN-1826 plazmidot szelektálunk további felhasználáshoz.

A pKFN-1826 plazmidból származó 418 bp-ú EcoRI-XbaI fragmenst a pMT636-ból származó, 9,5 kb nagyságú NcoI-XbaI fragmenshez és a pMT636-ból származó, 5,4 kb nagyságú NcoI-EcoRI fragmenshez ligáljuk, a pKFN-1827 plazmidot nyerve.

A pMT636 plazmidot a PCT/DK88/00138 számú Nemzetközi Szabadalom írja le. A pMT636 egy *E.coli* - *S.cerevisiae* shuttle vektor, ami a *Schizosaccharomyces pombe* TPI gént (POT) [Russel P. R., *Gene*, 40:125-130 (1985)], a *S.cerevisiae* triózfoszfát-izomeráz promotert és terminátort, TPI_p és TPI_T-t [Albert T. és Kawasaki G., *J. Mol. Appl. Gen.*, 1:419-434 (1982)] tartalmazza.

A pKFN-1827 plazmid expressziós kazettája az alábbi szekvenciát tartalmazza:

TPI_p - KFN1000 szignál-leader - HKIB9-TPI_T.

A pKFN-1827 plazmid konstrukcióját a 3. ábra szemlélteti.

A pKFN-1827-ből származó, 424 kb nagyságú EcoRI-XbaI fragmens DNS szekvenciáját a SEQ ID No.8.mutatja.

Élesztő transzformálás: *S.cerevisiae* MT663 törzset (E2-7B XE11-36, a/α, Δ_{tpi}/Δ_{tpi}, pep 4-3/pep 4-3) YPGaL tápközegben (1 % Bacto élesztőkivonat, 2 % Bacto pepton, 2 % galaktóz, 1 % laktát) tenyésztünk, amíg el nem éri az O.D 600 nm:0,6 értéket.

100 ml tenyészlevet centrifugálunk, az üledéket 10 ml vízzel



mossuk, újra centrifugálunk és az üledéket 10 ml alábbi összetételű oldatban szuszpendáljuk: 1,2M szorbitol, 25mM Na₂EDTA, pH = 8,0 és 6,7 mg/ml ditiotreitol. A szuszpenziót 30°C hőmérsékleten inkubáljuk 15 percen át, centrifugáljuk és a sejteket 10 ml alábbi összetételű oldatban szuszpendáljuk: 1,2M szorbitol, 10mM Na₂EDTA, 0,1M nátrium-citrát, pH = 5,8 és 2 mg Novozym[®]234. A szuszpenziót 30°C hőmérsékleten inkubáljuk 30 percen át, a sejteket centrifugálással összegyűjtjük, 10 ml 1,2M szorbitol-oldattal és 10 ml CAS oldattal (1,2M szorbitol, 10mM kalcium-klorid, 10mM Trisz.HCl, Trisz = trisz(hidroxi-metil)-amino-etán, pH = 7,5) mossuk és 2 ml CAS oldatban szuszpendáljuk. A transzformációhoz 0,1 ml CAS-ban szuszpendált sejtet összekeverünk 1 µg pKFN-1827 plazmiddal, és a szuszpenziót szobahőmérsékleten hagyjuk állni 15 percen át. 1 ml alábbi összetételű oldatot adunk hozzá: 20 % polietilén-glikol 4000, 20mM kalcium-klorid, 10mM kalcium-klorid, 10mM Trisz.HCl, pH = 7,5 és a szuszpenziót 30 percen át szobahőmérsékleten hagyjuk állni. A szuszpenziót centrifugáljuk, az üledéket 0,1 ml SOS-ben (1,2M szorbitol, 33 térf.% YPD, 6,7mM kalcium-klorid, 14 µg/ml leucin) szuszpendáljuk és 30°C hőmérsékleten inkubálunk 2 órán át. A szuszpenziót centrifugáljuk, az üledéket 0,5 ml 1,2M szorbitol oldatban szuszpendáljuk, majd 6 ml 52°C hőmérsékletű top agart (Sherman és munkatársainak SC közege - Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory (1982) - ami 1,2M szorbitolt és 2,5 % agart tartalmaz) adunk hozzá, és a szuszpenziót ugyanennyi agart és szorbitolt tartalmazó lemez tetejére öntjük.

A transzformált telepeket 3 napos 30°C hőmérsékletű inkubálás után izoláljuk és felhasználjuk a folyékony tenyészetekhez. Egy KFN-1830 transzformánst szelektálunk a további jellemzéshez.

Fermentáció: a KFN-1830 élesztőtörzset YPD közegben (1 % élesztőkivonat, 2 % pepton (Difco) és 3 % glükóz) tenyésztjük. 200 ml térfogatú tenyészetet 30°C hőmérsékleten rázatunk, amíg az OD 650 nm érték eléri a 24 értéket. Centrifugálás után a felülúszót izoláljuk.

A felülúszó kémhatását 5 %-os ecetsavval és foszforsavval pH = 3,0 értékre állítjuk be és S-Sepharose Fast Flow oszlopra (Pharmacia) visszük, amit 50mM hangyasav-oldattal, pH = 3,7 ekvilibráltunk. Miután ekvilibrációs pufferral mostuk az oszlopot, a HKI-domént 1M nátrium-klorid oldattal eluáljuk. A sómentesítést Sephadex G-25 oszlopon (Pharmacia) végezzük, amit ekvilibrálnak és 0,1 % ammónium-hidrogén-karbonát oldattal, pH = 7,9 eluálunk. Vákuumcentrifugációval való betöményítés után a kémhatást pH = 3,0 értékre állítjuk be, és a további tisztítást Mono S oszlopon (Pharmacia) végezzük, amit 50mM hangyasav-oldattal, pH = 3,7, ekvilibráltunk. Az ekvilibrációs pufferrel való mosás után, grádiens eluálást alkalmazunk, ahol az ekvilibrációs pufferben a nátrium-klorid koncentrációját 0-ról 1M-ra emeljük. A végső tisztítást Vydac C4 fordított fázisú HPLC oszlopon végezzük (The Separation Group, CA, USA) a grádiens elúcióhoz 0,1 % TFA mellett az acetonitril koncentrációját 5 %-ról 55 %-ra emelve. A tisztított terméket fagyasztva szárítjuk és



vízben oldjuk.

A kivett mintákat tömeg PD-tömeg spektrometriával analizáljuk (talált mólsúly: 6853,5, számított mólsúly 6853,8). A mólsúly és az N-terminális aminosav szekvenálás (45 Edman degradációs ciklus) megerősíti a HKIB9 domén primer szerkezetét.

3. példa

HKIB9 többszörös mutációja a 16 és 16-os helyen

0,1 μ g, a pKFN-1827 plazmidból származó HKIB9-t kódoló, 1,3 kb nagyságú SphI-BamHI fragmenst használunk templátnak két PCR reakcióhoz. Az első PCR reakcióban 100 pmól NOR-2022 primert (GGAGTTTAGTGAACCTGC) és 100 pmól M-752 primert (GAAAACCATCGCGTCATGTAG8C/G)C (C/G)A)A/C)ACAAGGGC) alkalmazunk. A második reakcióhoz 100 pmól NOR-1495 (TAAGTGGCTCAGAATGA) és 100 pmól M-751 primert (GCCCTTGT(T/G)T(C/G)G(C/G)CTACATGACGCGATGGTTTTTC) használunk. A NOR-2022 az SphI hasítóhelytől lefelé a 94. bp helyen kezd. Az M-752 összeillő a SEQ ID 8. 276-310. HKIB9 DNS-szekvenciájával, öt eltérés kivételével. A NOR-1495 a BamHI hasítóhelytől felfelé az 561. bp helyen kezd. Az M-751 összeillő az M-752-vel.

A PCR reakciót 100 μ l térfogatban végezzük kereskedelmi készlet felhasználásával (GeneAmp, Perkin Elmer Cetus) és az alábbi ciklusban: 95°C 1 percen át, 50°C 1 percen át és 72°C 2 percen át. 24 ciklus után a végső ciklus 72°C hőmérsékletű lépése 10 perces. A PCR termékeket - 449 bp nagyságú fragmens az első PCR reakcióból és 279 bp nagyságú fragmens a másodikból - 2 %-os

agarózgélen izoláljuk elektroforézissel.

Mindkét fenti fragmensből kb. 0,1 μ g mennyiségeket összekeverünk. PCR reakciót végzünk 100 pmól NOR-2022 primert és 100 pmól NOR-1495 primert használva, a ciklus: 95°C 1 percen át, 50°C 2 percen át és 72°C 3 percen át. 22 ciklus után a befejező ciklus 72°C hőmérsékletű lépése 10 perces.

A nyert 693 bp nagyságú fragmenst 1 %-os agarózgélen elektroforézissel tisztítjuk, majd EcoRI és XbaI enzimekkel hasítjuk. A kapott 418 bp nagyságú fragmenst a pTZ19R plazmid 2,8 kb nagyságú EcoRI-XbaI fragmenséhez ligáljuk [Mead D.A., Szczesna-Skoapura E. és Kemper B., Prot. Engin. 1:67-74 (1986)].

A ligációs elegyet használjuk fel a kompetens E.coli törzs (r^- , m^+) transzformálásához, ampicillinrezisztenciára szelektálva. DNS szekvenálással az alábbi öt olyan plazmid azonosítható, mely a jelzett HKIB9 analógokat kódolja hozzákötve a szintetikus élesztő szignál-leader génhez:

plazmid	analóg
pKFN-1892	[Q15V, T16G]-HKIB9
pKFN-1916	[Q15V, T16A]-HKIB9
pKFN-1909	[Q15F, T16G]-HKIB9
pKFN-1912	[Q15F, T16A]-HKIB9
pKFN-1913	[Q15L, T16A]-HKIB9

Ezekből az plazmidokból a 418 bp nagyságú EcoRI-XbaI fragmenseket használjuk fel a 2. példában leírt expressziós

plazmidok összeállításához.

Az MT-663 élesztőtörzs transzformálása, amint azt a 2. példában leírtuk az alábbi élesztőtörzset eredményezte:

élesztő törzs	analóg
-----	-----
KFN-1902	[015V, T16G]-HKIB9
KFN-1930	[Q15V, T16A]-HKIB9
KFN-1932	[Q15F, T16G]-HKIB9
KFN-1965	[Q15F, T16A]-HKIB9
KFN-1966	[Q15L, T16A]-HKIB9
-----	-----

A transzformált élesztőtörzsek YDP közegben történő tenyésztése a 2. példában leírtak szerint történik.

4. példa

[Q15K]-HKIB9 és [Q15K, T16A]-HKIB9 termelése KFN-1974 és KFN-1975 élesztőtörzsekkel

0,1 μ g, a pKFN-1827 plazmid HKIB9-t kódoló 1,3 kb-ú SphI-BamHI fragmensét használjuk templátként két PCR reakcióhoz. Az első reakcióban 100 pmól NOR-2022 (GGAGTTTAGTGAACCTGTC) primert és 100 pmól M-755 (GCGTCATGTAGG(C/T)TTTACAAGGGC) primert használunk. A NOR-2022 az SphI helytől lefelé a 94. bp helyen indít. Az M-755 összeillő a SEQ ID No.8. 276-299 HKIB9 DNS szekvenciával, két eltérést kivéve. A NOR-1495 a BamHI helytől felfelé az 561. bp helynél indít. Az M-759 összeillő az M-755-tel.

A PCR reakciót 100 μ l térfogatban hajtjuk végre kereskedelmi készletet használva (GenAmp, Perkin Elmer Cetus), a ciklus: 95°C 1 percen át, 50°C 1 percen át és 72°C 2 percen át. 24 ciklus után a végső ciklus 72°C hőmérsékletű lépése 10 perces. A PCR terméket - 438 bp fragmens az első és 279 bp fragmens a második PCR reakcióból - elektroforézissel nyerjük ki 2 %-os agarózgélen.

A fenti két PCR fragmensekből kb. 0,1-0,1 μ g mennyiséget összekeverünk. A PCR reakciót 100 pmól NOR-2022 és 100 pmól NOR-1495 felhasználásával hajtjuk végre, a ciklus: 95°C 1 percen át, 50°C 2 percen át és 72°C 3 percen át. 22 ciklus után a végső ciklus 72°C hőmérsékletű lépése 10 perces.

A nyert 693 bp nagyságú fragmenst 1 %-os agarózgélen elektroforézissel tisztítjuk, majd EcoRI és XbaI enzimekkel hasítjuk. A nyert 418 bp nagyságú fragmenst a pTZ19R plazmid 2,8 kb-ú EcoRI-XbaI fragmenséhez [Mead D.A., Szczesna-Skopura E. és Kemper B., Prot. Engin., 1:67-74 (1986)] ligáljuk.

A ligációs elegyet használjuk a kompetens E.coli törzs (r^- , m^+) transzformálására, ampicillinrezisztenciára szelektálva. DNS szekvenálással az alábbi két olyan plazmidot azonosítottuk, melyek a jelzett HKIB9 analógokat kódolják a szintetikus élesztő szignál-leader génhez kapcsolva:

plazmid	analóg
-----	-----
pKFN-1919	[Q15K]-HKIB9
pKFN-1921	[Q15K, T16A]-HKIB9
-----	-----

E plazmidok 418 bp nagyságú EcoRI-XbaI fragmenseit használjuk a 2. példában leírt expressziós plazmidok összeállítására.

Az MI-663 élesztőtörzs 2. példában leírt transzformációjával az alábbi törzsekhez jutottunk:

élesztőtörzs	analóg
-----	-----
KNF-1974	[Q15K]-HKIB9
KFN-1975	[Q15K, T16A]-HKIB9
-----	-----

A transzformált élesztőtörzset a 2. példában leírtak szerint tenyésztjük YPD tápközegben.

5. példa

Szerin-proteináz gátlása HKIB9 KFN1902 és 1930 variánsokkal

A Kunitz domén variánsokat a tenyészléből izoláljuk a 2. példában leírt eljárással.

A koncentrációjukat 214 nm-nél mért elnyelés alapján határozzuk meg, összehasonlító anyagnak aprotinint használva. A sertéstripszint a Novo Nordisk A/S cégtől, a borjúkimotripszint (TLCK kezelt) a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) cégtől szereztük be. A humán neutrofil katepszin G-t és az elasztázt PMN-extraktumból izoláljuk Bangh és Travis módszerével [Biochemistry 15:836-843 (1976)].

A peptidil-nitro-anilid szubsztrát S2251-et és S2586-ot a Kabi-tól (Stockholm, Svédország), az S7388-at és M4765-öt a Sigma

Chemical Co.-tól kaptuk.

A KFN 1902 és a KFN 1930 gátolja a neutrofil elasztázt ($K_1 = 140$ nM, illetve 64 nM), gyengén gátolja a kimotripszint (5 %) 1 μ M-nál, de ilyen körülmények között nem gátolja a tripszint és a katepszin G-t.

A kísérletek azt mutatják, hogy lehetőség van arra, hogy ismert gátlási funkcióval nem rendelkező Kunitz domént egy elasztázinhibítorrá átalakítsuk.

SZEKVENCIA LISTA

1) INFORMÁCIÓK:

i) Bejelentő:

a) név: Novo Nordisk A/S

b) utca: Novo Alle

c) város: Bagsvaerd

e) ország: Dánia

f) postai irányítószám: DK-2880

g) telefon: +45 4444 8888

h) telefax: +45 4449 3256

i) telex: 37304

ii) A bejelentés címe: Humán Kunitz-típusú proteázgátló és változatai

iii) A szekvenciák száma: 9

iv) számítógéppel olvasható forma

a) adathordozó típusa Floppy disk

b) számítógép: IBM PC kompatibilis

c) operációs rendszer: PC-DOS/MS-DOS

d) Softwer: PatentIn Release #1.0, Version #1,25 (EPO)

2) Adatok a SEQ ID No.1-hez:

i) a szekvencia jellemzői:

a) hossza: 60 aminosav

b) típusa; aminosav

d) szerkezete: lineáris

ii) a molekula típusa: fehérje

vi) eredete

a) organizmus: Homo sapiens

xi) a szekvencia leírása SEQ ID No.1:

Asp Leu Leu Pro Asn Val Cys Ala Phe Pro Met Glu Lys Gly Pro Cys
 1 5 10 15

Gln Thr Tyr Met Thr Arg Trp Phe Phe Asn Phe Glu Thr Gly Glu Cys
 20 25 30

Glu Leu Phe Ala Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Ser Asn Asn Phe Leu
 35 40 45

Arg Lys Glu Lys Cys Glu Lys Phe Cys Lys Phe Thr
 50 55 60

2) Adatok a SEQ ID No.2-höz:

i) A szekvencia jellemzői:

a) szekvencia hossza: 57 aminosav

b) típusa: aminosav

d) szerkezete: lineáris

ii) a molekula típusa: fehérje

vi) eredete

a) organizmus: szintetikus

xi) a szekvencia leírása SEQ ID No.2:

Xaa Asn Val Cys Ala Phe Pro Met Glu Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Trp Phe Phe Asn Phe Glu Thr Gly Glu Cys Glu Leu Phe
 20 25 30

Xaa Tyr Gly Gly Cys Xaa Xaa Xaa Ser Asn Asn Phe Xaa Xaa Xaa Glu
 35 40 45

Lys Cys Glu Lys Phe Cys Lys Phe Xaa
 50 55

Adatok a SEQ ID No. 3-hoz:

i) A szekvencia jellemzői:

- a) hossza: 60 aminosav
- b) típusa: aminosav
- d) szerkezete: lináris
- ii) a molekula típusa: fehérje
- vi) eredete
 - a) organizmus: szintetikus
- xi) a szekvencia leírása SEQ ID No.3:

Asp	Leu	Leu	Pro	Asn	Val	Cys	Ala	Phe	Pro	Met	Glu	Lys	Gly	Pro	Cys
1				5					10					15	
Lys	Ala	Arg	Ile	Ile	Arg	Trp	Phe	Phe	Asn	Phe	Glu	Thr	Gly	Glu	Cys
			20				25						30		
Glu	Leu	Phe	Val	Tyr	Gly	Gly	Cys	Arg	Ala	Lys	Ser	Asn	Asn	Phe	Lys
		35					40					45			
Ser	Lys	Glu	Lys	Cys	Glu	Lys	Phe	Cys	Lys	Phe	Thr				
	50					55					60				

Adatok a SEQ ID No.4-hez:

- i) A szekvencia jellemzői:
 - a) hossza: 502 bázispár
 - b) típusa: nuklinsav
 - c) száltípus: egyszálú
 - d) szerkezete: lineáris
- ii) a molekula típusa: DNS (genomiális)
- vi) eredete:
 - a) organizmus: Homo sapiens
- ix) azonosító jegye
 - a) név/jel: CDS
 - b) elhelyezkedés: 187...366
- xi) a szekvencia leírása SEQ ID No.4:

AAATGTCAAC TTCTGTGTAG ACAGATCAGA CCATAGCTGG GTAGAAAGAG GTACAGAGCA	60
CAGCCATTGT GGATGGCCTC ACAATTGTGC CCAGGGCTGT CACAGCCCCT GGCATATGAG	120
GCAAACAAGG AGAAGGTGAT GGGTTTGGTC TCCTTCAACC ACTTTCTCTC TTCAGACACT	180
ATCAAG GAT CTC CTC CCA AAT GTA TGC GCT TTT CCT ATG GAA AAG GGC	228
Asp Leu Leu Pro Asn Val Cys Ala Phe Pro Met Glu Lys Gly	
1 5 10	
CCT TGT CAA ACC TAC ATG ACG CGA TGG TTT TTC AAC TTT GAA ACT GGT	276
Pro Cys Gln Thr Tyr Met Thr Arg Trp Phe Phe Asn Phe Glu Thr Gly	
15 20 25 30	
GAA TGT GAG TTA TTT GCT TAC GGA GGC TGC GGA GGC AAC AGC AAC AAC	324
Glu Cys Glu Leu Phe Ala Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Ser Asn Asn	
35 40 45	
TTT TTG AGG AAA GAA AAA TGT GAG AAA TTC TGC AAG TTC ACC	366
Phe Leu Arg Lys Glu Lys Cys Glu Lys Phe Cys Lys Phe Thr	
50 55 60	
TGATTTTCTA ACAAGAACAC AGCCCTCCAT GGATTGGGA TTGCTCTGAG GGCCATAGAA	426
GGCATTGGOG TGIGIGTGTG TGTGTGTGTG TGAACAAGAG GTTCATTTCC TCTACCCCCA	486
CATTTATTCT CCTGA	502

- 2) Adatok a SEQ ID No.5-höz:
- i) A szekvencia jellemzői:
 - a) hossza: 60 aminosav
 - b) típusa: aminosav
 - d) szerkezete: lineáris
 - ii) a molekula típusa: fehérje
 - xi) a szekvencia leírása SEQ ID No.5:



Asp Leu Leu Pro Asn Val Cys Ala Phe Pro Met Glu Lys Gly Pro Cys
1 5 10 15
Gln Thr Tyr Met Thr Arg Trp Phe Phe Asn Phe Glu Thr Gly Glu Cys
20 25 30
Glu Leu Phe Ala Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Ser Asn Asn Phe Leu
35 40 45
Arg Lys Glu Lys Cys Glu Lys Phe Cys Lys Phe Thr
50 55 60

2) Adatok a SEQ ID No.6-hoz:

i) A szekvencia jellemzői:

- a) hossza: 235 bázispár
- b) típusa: nuklinsav
- c) száltípusa: egyszálú
- d) szerkezete: lineáris

ii) molekulatípus: cDNS

vi) eredete

- a) organizmus: szintetikus

ix) azonosító jegye

- a) név/jel: CDS
- b) elhelyezkedés: 77..235

xi) a szekvencia leírása SEQ ID No.6:

GAATTCATT CAAGAATAGT TCAAACAAGA AGATTACAAA CTATCAATTT CATAACAAT	60
ATAAACGACC AAAAGA ATG AAG GCT GGT TTC TTG GGT TTG TCC TTG ATC	109
Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile	
1 5 10	
GGA TTC TGC TGG GCC CAA CCA GTC ACT GGC GAT GAA TCA TCT GGT GAG	157
Gly Phe Cys Trp Ala Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu	
15 20 25	
ATT CCG GAA GAG TCT CTG ATC ATC GCT GAA AAC ACC ACT TTG GCT AAC	205
Ile Pro Glu Glu Ser Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn	
30 35 40	
GTC GCC ATG GCT GAG AGA TTG GAG AAG AGA	235
Val Ala Met Ala Glu Arg Leu Glu Lys Arg	
45 50	

2) Adatok a SEQ ID No.7-hez:

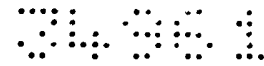
i) A szekvencia jellemzői:

- a) hossza: 53 aminosav
- b) típusa: aminosav
- d) szerkezete: lineáris

ii) a molekula típusa: fehérje

xi) a szekvencia leírása SEQ ID No.7:

Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile Gly Phe Cys Trp Ala	
1 5 10 15	
Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu Ile Pro Glu Glu Ser	
20 25 30	
Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn Val Ala Met Ala Glu	
35 40 45	
Arg Leu Glu Lys Arg	
50	



2) Adatok a SEQ ID No. 8-hoz:

i) A szekvencia jellemzői:

a) hossza: 427 bázispár

b) típusa: nuklinsav

c) száltípusa: egyszálú

d) szerkezete: lineáris

ii) a molekula típusa: cDNS

vi) eredete

a) organizmus: szintetikus/humán

ix) azonosító jegye

a) névjel: szignálpeptid

b) elhelyezkedés: 77...235

ix) azonosító jegye

a) név/jel: érett peptid

b) elhelyezkedés: 236...415

ix) a szekvencia leírása SEQ ID No. 8:

a) jellege: CDS

b) helye: 77..415

```
GAATTCATT CAAGAATAGT TCAAACAAGA AGATTACAAA CTATCAATTT CATAACAAT      60
ATAAAGACC AAAAGA ATG AAG GCT GTT TTC TTG GTT TTG TCC TTG ATC      109
          Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile
          -53          -50          -45

GGA TTC TGC TGG GCC CAA CCA GTC ACT GGC GAT GAA TCA TCT GTT GAG      157
Gly Phe Cys Trp Ala Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu
          -40          -35          -30

ATT CCG GAA GAG TCT CTG ATC ATC GCT GAA AAC ACC ACT TTG GCT AAC      205
Ile Pro Glu Glu Ser Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn
          -25          -20          -15
```


Met Lys Ala Val Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile Gly Phe Cys Trp Ala
 -53 -50 -45 -40

Gln Pro Val Thr Gly Asp Glu Ser Ser Val Glu Ile Pro Glu Glu Ser
 -35 -30 -25

Leu Ile Ile Ala Glu Asn Thr Thr Leu Ala Asn Val Ala Met Ala Glu
 -20 -15 -10

Arg Leu Glu Lys Arg Asp Leu Leu Pro Asn Val Cys Ala Phe Pro Met
 -5 1 5 10

Glu Lys Gly Pro Cys Gln Thr Tyr Met Thr Arg Trp Phe Phe Asn Phe
 15 20 25

Glu Thr Gly Glu Cys Glu Leu Phe Ala Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn
 30 35 40

Ser Asn Asn Phe Leu Arg Lys Glu Lys Cys Glu Lys Phe Cys Lys Phe
 45 50 55

Thr
 60

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Humán, Kunitz-típusú proteázinhibítor, azzal j e l l e m e z v e, hogy aminosavszekvenciája:
 Leu Pro Asn Val Cys Ala Phe Pro Met Glu Lys Gly Pro Cys Gln Thr
 Tyr Met Thr Arg Trp Phe Phe Asn Phe Glu Thr Gly Glu Cys Glu Leu
 Phe Ala Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Ser Asn Asn Phe Leu Arg Lys
 Glu Lys Cys Glu Lys Phe Cys Lys Phe Thr (SEQ ID No. 1)
 vagy ennek protázgátló tulajdonságokkal rendelkező változata.

2. A humán, Kunitz-típusú proteázinhibítor 1. igénypont szerinti változata, ahol az aminosavszekvencia:
 X^1 Asn Val Cys Ala Phe Pro Met Glu X^2 Gly X^3 Cys X^4 X^5 X^6 X^7 X^8
 X^9 Trp Phe Phe Asn Phe Glu Thr Gly Glu Cys Glu Leu Phe X^{10} Tyr
 Gly Gly Cys X^{11} X^{12} X^{13} Ser Asn Asn Phe X^{14} Arg Lys Glu Lys Cys
 Glu Lys Phe Cys Lys Phe X^{15} (SEQ ID No. 2)
 melyen belül X^1 jelentése hidrogénatom vagy 1-5 természetes aminosavrész, a Cys kivételével, X^2 - X^{14} jelentése egymástól függetlenül természetes aminosavrész, X^{15} jelentése hidroxilcsoport vagy 1-5 természetes aminosavrész, a Cys kivételével, azzal a feltétellel, hogy az X^1 - X^{15} aminosavrész legalább egyike különbözik a natív szekvencia megfelelő aminosavrésztől.

3. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X^1 jelentése Leu-Pro.

4. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X^2 jelentése Ala, Arg, Thr, Asp, Pro, Glu, Lys, Gln, Ser, Ile vagy Val.
5. A 4. igénypont szerinti változat, ahol X^2 jelentése Thr vagy Lys.
6. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X^3 jelentése Pro, Thr, Leu, Arg, Val vagy Ile.
7. A 6. igénypont szerinti változat, ahol X^3 jelentése Pro vagy Ile.
8. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X^4 jelentése Lys, Arg, Val, Thr, Ile, Leu, Phe, Gly, Ser, Met, Trp, Tyr, Gln, Asn vagy Ala.
9. A 8. igénypont szerinti változat, ahol X^4 jelentése Lys, Val, Leu, Ile, Thr, Met, Gln vagy Arg.
10. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X^5 jelentése Ala, Gly, Thr, Arg, Phe, Gln vagy Asp.
11. A 10. igénypont szerinti változat, ahol X^5 jelentése Ala, Thr, Asp vagy Gly.
12. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X^6 jelentése Arg,

Ala, Lys, Leu, Gly, His, Ser, Asp, Gln, Glu, Val, Thr, Tyr, Phe, Asn, Ile vagy Met.

13. A 12. igénypont szerinti változat, ahol X^6 jelentése Arg, Phe, Ala, Leu vagy Tyr.

14. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X^7 jelentése Ile, Met, Gln, Glu, Thr, Leu, Val vagy Phe.

15. A 14. igénypont szerinti változat, ahol X^7 jelentése Ile.

16. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X^8 jelentése Ile, Thr, Leu, Asn, Lys, Ser, Gln, Glu, Arg, Pro vagy Phe.

17. A 16. igénypont szerinti változat, ahol X^8 jelentése Ile vagy Thr.

18. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X^9 jelentése Arg, Ser, Ala, Gln, Lys vagy Leu.

19. A 18. igénypont szerinti változat, ahol X^9 jelentése Arg.

20. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X^{10} jelentése Gln, Pro, Phe, Ile, Lys, Trp, Ala, Thr, Leu, Ser, Tyr, His, Asp,

Met, Arg vagy Val.

21. A 20. igénypont szerinti változat, ahol X^{10} jelentése Val vagy Ala.

22. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X^{11} jelentése Gly, Met, Gln, Glu, Leu, Arg, Lys, Pro vagy Asn.

23. A 22. igénypont szerinti változat, ahol X^{11} jelentése Arg vagy Gly.

24. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X^{12} jelentése Ala vagy Gly.

25. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X^{13} jelentése Lys, Asn vagy Asp.

26. A 25. igénypont szerinti változat, ahol X^{13} jelentése Lys vagy Asn.

27. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X^{14} jelentése Val, Tyr, Asp, Glu, Thr, Gly, Leu, Ser, Ile, Gln, His, Asn, Pro, Phe, Met, Ala, Arg, Trp vagy Lys.

28. A 27. igénypont szerinti változat, ahol X^{14} jelentése Lys vagy Leu.

29. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X¹⁵ jelentése Thr.

30. A 2. igénypont szerinti változat, ahol X¹ jelentése Leu-Pro és X¹⁵ jelentése Thr.

31. A 2. igénypont szerinti változat, ahol az aminosavszekvencia:

Leu Pro Asn Val Cys Ala Phe Pro Met Glu Lys Gly Pro Cys Lys Ala
 Arg Ile Ile Arg Trp Phe Phe Asn Phe Glu Thr Gly Glu Cys Glu Leu
 Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Ser Asn Asn Phe Leu Arg Lys
 Glu Lys Cys Glu Lys Phe Cys Lys Phe Thr (SEQ ID No. 3).

32. DNS szerkezet, azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont szerinti humán, Kunitz-típusú proteázinhibítort vagy a 2-31. igénypontok bármelyike szerinti változatát kódolja.

33. Rekombináns expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy a 32. igénypont szerinti DNS szerkezetet tartalmazza.

34. A 32. igénypont szerinti DNS szerkezetet vagy a 33. igénypont szerinti expressziós vektort tartalmazó sejt.

35. Eljárás az 1. igénypont szerinti humán, Kunitz-típusú proteázinhibítort vagy a 2-31. igénypont bármelyike szerinti változatának előállítására, azzal jellemezve, hogy a 34. igénypont szerinti sejtet olyan körülmények között tenyésztjük,

mely a protein kifejeződését eredményezi, és a kapott fehérjét kinyerjük a tenyészléből.

36. Gyógyszerkészítmény, azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont szerinti humán, Kunitz-típusú proteázinhibítort vagy annak 2-31. igénypontok bármelyike szerinti változatát tartalmazza gyógyászati szempontból alkalmazható vivőanyag vagy közegként szolgáló anyag kíséretében.

Led

A meghatalmazott

beeeeb

1940/1980

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



3/1

1. ábra

Humán Kunitz-típusú proteázinhibítor-domének

ITI-1: KEDSCQLGYSAGPCMGMTSRYFYNGTSMACETFQYGGCMGNGNMFVTEKECLQTCRTV
 ITI-2: TVAACNLPIVRGPCRAFIQLWAFDAVKGKCVLFPYGGCQGNNGNKFYSEKECREYCGVP
 APPI : VREVCSEQAETGPCRAMISRWFVDVTEGKCAPFFYGGCGGNRNNFDTEEYCMVCGSA
 TFPI1: MHSFCAFKADDGPKCAIMKRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFEESLEECKMCTRD
 TFPI2: KPDFCFLEEDPGICRGYITRYFYNNQTKQCERFKYGGCGLGNMNNFETLEECKNICEDG
 TFPI3: GPSWCLTPADRGLCRANENRFYNSVIGKCRPFKYSGCGGNENNFTSKQECLRACKKG
 α3-VI: ETDICKLPKDEGTCRDFILKWYYDPNTKSCARFWYGGCGGNENKFGSQKECEKVCAPV
 APROT: RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGA
 I * * II

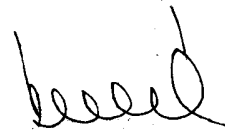
- ITI-1(2): Inter alfa tripszin inhibítor KPI-domén 1(2)
- APPI: Alzheimer kór amiloid protein előnyag KPI domén
- TFPI 1(2,3): "Szöveti faktor pathway" inhibítor KPI-domén 1(2,3)
- alfa 3-VI: VI típusú kollagén alfa 3 lánc C-terminális KPI doménje
- APROT: Bázikus borjúhalnyálmirigy-típusú inhibítor, BPTI vagy aprotini

Handwritten signature or initials.

2. ábra

Kunitz domén PCR primerek

- A: 5' GTTGGAAATTCGGNCCNTG(T/C)AA(A/G)G 3' 23-mer
B: 5' GTTGGAAATTCGGNCCNTG(T/C)CG 3' 21-mer
C: 5' GTTGGAAATTCGGNNT(T/C)TG(T/C)AA(A/G)G 3' 23-mer
E: 5' GTTGGAAATTCGGNNT(A/G)TG(T/C)AA(A/G)G 3' 23-mer
F: 5' GTTGGAAATTCGGNNT(T/C)TG(T/C)CG 3' 21-mer
H: 5' GTTGGAAATTCGGNNT(A/G)TG(T/C)CG 3' 21-mer
- X: 5' GGTTTCTAGA(A/G)CANCC(A/G)CC(A/G)TA 3' 22-mer
Y: 5' GGTTTCTAGA(A/G)CANCC(T/C)CC(A/G)TA 3' 22-mer
Z: 5' GGTTTCTAGA(A/G)CANCC(A/G)CT(A/G)TA 3' 22-mer



3. ábra

