

(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG  
ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL**

# SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

**206 520 B**

(21) A bejelentés száma: 1676/86  
(22) A bejelentés napja: 1986. 04. 21.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
725 468 1985. 04. 22. US  
(83) Letétbe helyezés: ATCC 23724; ATCC 27325;  
ATCC 31446; ATCC 33876

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

**C 12 N 15/58**  
C 12 P 21/02  
A 61 K 37/54  
C 12 N 5/10

(40) A közzététel napja: 1987. 01. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1992. 11. 30. SZKV 92/11

(72) Feltalálók:

Heyneker, Herbert Luis, Hillsborough, Kalifornia (US)  
Vehar, Gordon Allen, San Carlos, Kalifornia (US)

(73) Szabadalmas:

Genentech Inc., San Francisco,  
Kalifornia (US)

(54)

## **Eljárás új humán plazminogén aktivátor (t-PA) mutánsok és ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás a 270–279 aminosav-tartományban legalább a 275. helyen az eredeti szekvenciától eltérő aminosavat tartalmazó egyes szálú humán szöveti plazminogén aktivátor mutánsokat kódoló DNS szekvencia előállítására oly módon, hogy

a 2. ábra 1–527 aminosavait kódoló, de a 270–279. aminosavnak megfelelő helyen CGC-től eltérő DNS szekvenciát, amely kívánt esetben valamely szignál-peptidet kódoló szekvenciával, továbbá 3' és 5' nem transzlatált területet jelentő szekvenciával van kiegészítve, önmagában ismert kémiai és/vagy biotechnológiai módszerekkel alakítják ki, előnyösen.

a megfelelő, t-PA-t kódoló DNS szekvenciának a 270–279. aminosavnak megfelelő tartományában legalább a 275. aminosavnak megfelelő CGC kódot pontmutációval cserélik ki.

A találmány kiterjed a fenti DNS szekvenciát magában foglaló vektor és az említett t-PA mutáns kifejezésére képes sejt- vagy szövettenyészet eredetű transzformánsok valamint az új t-PA mutánsokat tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására is.

A találmány új humán szöveti plazminogén aktivátor (t-PA) mutánsokra vonatkozik. Ezek a mutánsok, bár korábban általános formában már kinyilvánításra kerültek a 725 468 számú USA-beli szabadalmi bejelentésben, újak, olyan speciális származékok, amelyek olyan aktivitást mutatnak, amely nem vezethető le a korábbi, a humán szöveti plazminogén aktivátor alapelektromos vagy modell szerint proteáz tripszinnel vagy kimotripszinnel végzett kutatások eredményeiből.

A humán szöveti plazminogén aktivátort először lényegében tiszta, természetes forrásból származó izolátumként azonosították, és vizsgálták plazminogén aktivitás szempontjából (Collen és munkatársai, 041 766 számon közrebocsátott európai szabadalmi bejelentés.)

Később laboratóriumunkban rekombináns DNS technikával olyan humán szöveti plazminogén aktivátort állítottunk elő, amely lényegében mentes volt az őt rendszerint kísérő proteinektól. Erről a munkáról beszámoltunk a szakirodalomban, és a 093 619 számon közrebocsátott európai szabadalmi bejelentésben. A fenti szabadalmi bejelentés különböző humán plazminogén aktivátor származékok előállításával foglalkozik, amelyekben a módosítások aminosav szubsztitúciókkal, deléciókkal, addíciókkal vagy olyan helyettesítésekkel történtek, amelyek például a szóbanforgó DNS hely-irányított mutagenézisével jöttek létre.

A humán szöveti plazminogén aktivátor (t-PA) egyes és kettős szálú formában egyaránt létezik. Az utóbbi az előbbinek proteolitikus származéka. Kimutattuk, hogy az egyes szálú formának kettős szálú formává történő proteolitikus konverziója egy fibrin-szóma lizise során megy végbe [Rijken és munkatársai, J. Biol. Chem. 257, 2920 (1982)]. Feltehetőleg a kettős láncú forma felelős a plazminogén aktivátor aktivitásért, bár korábban megjelent néhány olyan közlemény is, amelyek szerint a humán t-PA egyes szálú formája (Rijken *ibid.*) és a sertés t-PA egyes szálú formája [Ranby és munkatársai, Thromb. Res. 27, 176 (1982)] is rendelkezik bizonyos aktivitással. Ezzel kapcsolatban lásd még: Rijken és munkatársai Biochim. Biophys. Acta 580, 140 (1979).

Későbbi vizsgálatok szerint azonban ezekben az esetekben az egyes szálú forma feltételezett aktivitása voltaképpen a jelenlevő, kis mennyiségű kettős láncú szennyezés következménye volt [Andreasen és munkatársai, FEBS Letters 175, 412 (1984)]. Ezek a közlemények megerősítették azt az általános feltevést, hogy a szerin proteázok, beleértve a t-PA-t inaktív, egyes szálú zimogéneként fejeződnek ki, amelyek csupán a proteín speciális helyein, például t-PA esetében a 275 helyzetű argininnél lejátszódó hidrolízise útján aktiválódnak.

Nyulakon és kutyákon elvégezték az egyes szálú és a kettős szálú plazminogén aktivátorok fibrin-szóma lizisét eredményező aktivitásának összevetését. Nyulak esetében az enzim két formájára közel azonos potenciált figyeltek meg [Collen és munkatársai, J. Clin. Invest. 71, 368 (1983)]. Kutyákon, hasonló modellen azonban az egyes szálú formát kissé kevésbé aktívnek találták, mint a kettős szálú formát [Korninger és munkatársai,

J. Clin. Invest. 69, 573 (1982)]. Ezek a vizsgálatok tehát azt mutatják, hogy az egyes szálú plazminogén aktivátor nem jobb, sőt esetleg kevésbé hatásos, mint a kettős szálú plazminogén aktivátor a fibrin-szóma in vivo feloldásában.

A találmány a humán t-PA új mutánsaira vonatkozik, amelyek meglepő módon legalább olyan vagy jobb aktivitást mutatnak, mint az elsőként Collen és munkatársai által izolált (041 766 számon közrebocsátott európai szabadalmi bejelentés) humán t-PA valamint a fent említett szabadalmi bejelentésben (093 619 számon közrebocsátott európai szabadalmi bejelentés) szereplő t-PA molekulák. Egy előnyös változat szerint a találmány szerinti specifikus mutánsok közé tartoznak azok, amelyek a humán t-PA aminosav szekvencia 275 és 276 pozícióit környező helyeken bizonyos aminosav szubsztitúciókkal rendelkeznek, közelebből azok, amelyekben ezeken a helyeken arginin, illetve izoleucin van jelen. Bizonyos enzimatikusan aktív molekulák felismerik ez(ek)e)t a helye(ke)t (talán egy vagy több szomszédos aminosavval együtt) és funkcionálisan hidrolizálják az alap aminosavak utáni kötéseket, különösen az arginin/izoleucin és a lizin/glicin kötéseket, kettős láncú anyagot eredményezve. A két lánc diszulfid kötések keresztlánca, a cisztein maradékok útján kapcsolatban marad egymással. A találmány e változata szerint például az ezeken a helyeken arginintől és lizintől eltérő aminosavakkal történő helyettesítés olyan mutánsokat szolgáltat, amelyekben a megfelelő hasítási helyek megváltoznak úgy, hogy a kettős láncú humán t-PA nem képződik in vitro vagy in vivo, vagy amelynek képződése csökkent sebességgel történik. Így a találmány e változata szerint mutagenizált egyes láncú humán t-PA-hoz lehet jutni, a biológiai aktivitás tesztelése céljából. Azt találtuk, hogy az ilyen mutánsok immunisak vagy legalábbis rezisztensek a 275/276 helyen történő hidrolízissel szemben, és hogy a keletkezett egyes szálú humán t-PA mutánsok váratlan egyezést mutatnak a Collen és munkatársai szerinti és/vagy a fentiekben leírt rekombináns t-PA molekulák aktivitásával bizonyos biológiai tesztekben. Ezen felül bizonyos jelek arra mutatnak, hogy ezek a mutánsok kevésbé reaktívak a természetesen fellépő t-PA inhibitorokkal.

#### A rajzok ismertetése.

1. ábra: A humán t-PA DNS-ének restrikciós térképe, amely felöleli az 5'- és 3'-nem-transzlatált régiókat, valamint a pre-t-PA-t kódoló szekvenciákat egyaránt. A pontozott terület a t-PA struktúrgénje.

2. a, b, c, d, e és f ábrák: a 12H és k10Hof pre-t-PA DNS és aminosav szekvenciákat mutatják, beleértve az 5'- és 3'-nem transzlatált régiókat.

3. ábra: A 275 helyen szubsztitúciókat tartalmazó egyedi klónok generálására alkalmazott általános séma.

4-8. ábrák: a pXAPPA18 3' X10trpR konstrukciója.

9. ábra: pPADHFr-6 a releváns restrikciós helyekkel.

10. ábra: a radioaktív-jelzett t-PA (baloldali ábra) és

az EIKGG t-PA (jobboldali ábra) által képzett plazma proteáz inhibitor komplexek, SDS-PAGE gélen végzett autoradiográfiás úton detektálva.

11. ábra: Az egyes szálú t-PA, a kettős szálú t-PA és a mutáns egyes szálú t-PA (EIKGG) fibrin kötő tulajdonságait szemlélteti.

12. ábra: az in vivo rög lízis dózis-válasz görbéje (egyes szálú t-PA-ra mutált EIK, rt-PA és nem-mutált t-PA).

A találmány ismertetése során a „humán szöveti plazminogén aktivátor”, a „humán t-PA” vagy „t-PA” kifejezések humán extrinsic (szöveti típusú) plazminogén aktivátort jelölnek, amely például rekombináns szövet tenyésztési rendszerekben keletkezik, olyan bioaktív formákban, amelyek egy proteáz részt tartalmaznak, és egyebekben megfelelnek a humán szövet számára natív plazminogén aktivátornak. Megjegyezzük, hogy természetes, allelomorfi változatok léteznek és előfordulnak, egyedtől függően, ami a szekvenciában aminosav differenciá(ka)t okozhat. Ezen felül a glükózilezési mérték függ a gazda sejtbeli környezetétől.

A humán szöveti plazminogén aktivátor olyan polipeptid, amely két funkcionális régióval rendelkezik, amelyek egy a plazminogén plazminná aktiválására alkalmas proteáz tartományból és egy „kringle”-tartományból állnak, ahol az utóbbi feltehetőleg a fibrin-kötésért felelős. Ezért a t-PA olyan polipeptideket jelöl, amelyek teljes szekvenciájuk részeként tartalmazzák ezeket a tartományokat.

A t-PA-ban egy „kettős lánc hasítási hely” legalább az arginin maradékot tartalmazza a 275 pozícióban. Azonban feltehetően a 275 pozícióval szomszédos vagy attól néhány maradékon belüli egyéb aminosavak is részei annak a tartománynak, amelyet a plazminogén aktivátort kettős láncú formába átalakító enzimek felismernek. Így a 275-től eltérő pozíciókban lévő aminosavak helyettesítése ezen a tartományon belül olyan mutáns plazminogén aktivátorokat eredményezhet, amelyek ellenállnak a kettős láncú formába történő átalakításnak.

Egy meghatározott fogatosítási mód szerint az „egyes láncú plazminogén aktivátor mutáns” egy olyan plazminogén aktivátor, amely rezisztens a kettős láncú formába történő átalakítással szemben. Jellemzői, hogy egy vagy több aminosav szubsztitúciót tartalmaz a kettős láncú aktivátor helyen. A módosítás következtében ez az aktivációs hely enzimatikusan nem felismert, ezért az enzimek, amelyek szokásosan a plazminogén aktivátort kettős láncú formába alakítják, nem hidrolizálják.

A tripszin és kimotripszin analógiájára feltételezhető, hogy bármilyen szerin proteáz kettős láncú formájának kifejeződéséhez fontos a szabad  $\alpha$ -aminocsoport jelenléte a t-PA 276. helyénél. Ennek értelmében az arg-275-nél hasítva a 276.  $\alpha$ -aminocsoport szabaddá válik arra a célra, hogy kölcsönhatásba kerüljön a t-PA aktív szerin helyében levő polipeptid láncsal. A jelen találmány tehát magában foglal minden olyan mutációt, amely eredményesen befolyásolja egy ilyen  $\alpha$ -aminocsoport kölcsönhatását proteáz-aktív hellyel anélkül,

hogy a molekula egészének általános aktivitását csökkentené.

Számos módszer alkalmazható a kérdéses DNS mutációinak létrehozására. A megváltozott szekvenciát tartalmazó DNS-t önmagában ismert kémiai módszerekkel állíthatjuk elő [Itakura és Riggs: „Chemical DNA Synthesis and Recombinant DNA Studies”, Science 209, 1401–1405 (1980)]. Egy ilyen módszer, amelyet itt egy különösen előnyös kiviteli módként szemléltetünk, abban áll, hogy először a natív t-PA gén egy olyan fragmensét, amely a mutáltatni kívánt tartományt kódoló szekvenciákat tartalmaz, az M13mp8 fág replikatív formájává inszertáljuk, az M13mp8PA-t létrehozva. Ezután az M13mp8PA egyes szálú formájához egy olyan szintetikus oligonukleotidot anellálunk, amely komplementer az inszertált t-PA szekvenciához, de egy vagy több olyan nukleotid tripletet tartalmaz, amelyek a helyettesíteni kívánt aminosavat kódolják. Ezáltal egy kettős szálú tartományt hozunk létre. Ez a tartomány szolgál a maradék komplementer szál DNS polimeráz I szintézisének primerjével. Replikálás és azonosítás után a mutáns t-PA szekvencia tovább módosítható vagy felhasználható egy a mutált t-PA polipeptid expressziójára szolgáló prokariota vagy eukariota vektor konstruálására.

A fentiekben ismertetett általános módszer alkalmazható a t-PA-nak a 275/276 és/vagy 277/278 kettős láncú hasítási helyektől eltérő pozíciókban történő mutálására is, olyan mutáns t-PA származékokat eredményezve, amelyek szintén a jelen találmány oltalmi körébe esnek. Ilyen egyéb pozíciók olyan polipeptid szekvenciák, amelyek enzimatisz hidrolízisre hajlamosak, így tripszin-szerű hasítási helyek, amelyek jellegzetes képviselője az izoleucin, szerin vagy alanin által követett arginin vagy lizin. Egy ilyen tripszin-szerű hasítási helyen egy vagy több aminosav szubsztitúciója olyan mutáns t-PA-kat eredményez, amelyek ellenállnak a tripszin-szerű proteázokkal végrehajtott hidrolízisnek. Ez az enzimatisz degradációval szembeni ellenállóképesség az expresszió és tisztítás során és az in vivo adagolás során is, gyógyszerként történő alkalmazás esetén, olyan t-PA-t eredményez, amely nem veszít biológiai aktivitásából a nem-mutált t-PA-val összehasonlítva. Ilyen tripszin-szerű hasítási helyek a humán t-PA molekulán belül például az arginin-alanin (40-41 pozíciók), az arginin-szerin (27-28 pozíciók) és az arginin-szerin (462-463 pozíciók).

#### A) Általános ismertetés

Mutáns t-PA származékokat készítünk 1. amelyek első aminosavként metionint tartalmaznak (az ATG start szignál kodonnak a struktúr gén előtt történő inszerciója következtében) vagy 2. amelyekben a metionin intra- vagy extracellulárisan hasítva van, és amely szokásos első aminosavat tartalmazza, vagy 3. amelyekben akár a szignál polipeptidjével együtt, akár egy szokásos szignál polipeptidjétől eltérő konjugált proteinnel együtt a szignál polipeptid vagy a konjugátum specifikusan hasítható az intra- vagy extracelluláris környezetben, vagy 4. közvetlen expresszióval, érett

formában, anélkül, hogy szükséges lenne bármely belső, felesleges polipeptid kihatása. Minden esetben az így létrehozott humán mutáns t-PA-t, különböző formáiban, kinyerjük és tisztítjuk mindaddig, míg érbetegségek vagy kóros állapotok, így miokardiális infarktus, szívroham, keringési embóliák, mély vénás trombózis, perifériás artériás elzáródás és más, trombotikus kondíciók kezelésére alkalmassá válik.

A humán mutáns t-PA-t funkcionálisan úgy definiáljuk, hogy képes a fibrinhez való kötődésre, és a plazminogén plazminná történő átalakulásának közvetítésére, ahol az utóbbi szolubilizálja a fibrin csomókat.

Az „expressziós vektor” kifejezés olyan vektorokra vonatkozik, amelyek képesek az itt leírt DNS szekvenciák expressziójára, ahol ezek a szekvenciák operábilisen kapcsolódnak más, expressziójukat befolyásolni képes szekvenciákhoz, és amelyek replikálhatók a gazda szervezetekben, akár episzomaként, akár a kromoszomális DNS integráns részeként.

A „rekombináns gazdasejtek” kifejezés olyan sejtekre vonatkozik, amelyeket rekombináns DNS technikákkal konstruált expressziós vektorokkal transzformáltunk.

#### B) Gazdasejt-kultúrák és vektorok

Az itt ismertetett vektorok és módszer prokariota és eukariota szervezetek közül választott gazdasejtek széles választékával kombinálva használhatók. Különösen alkalmas például az *E. coli* K12 294 törzs (ATCC 31 446). Más mikroorganizmus törzsek, például *E. coli* B. és *E. coli* X1776 (ATCC 31 537) szintén felhasználhatók. Ezek természetesen inkább illusztrációként szolgáló példák, és nem jelentenek semmiféle korlátozást.

A prokariotákön kívül eukariota szervezetek, így élesztő kultúrák is alkalmazhatók. Többsejtű szervezetből származó sejtek tenyésztési is felhasználásra kerültek már a legutóbbi időben. Elvben bármely ilyen sejttenyésztés működőképes, de az érdeklődés különösen a gerincesek sejtjeinek alkalmazása iránt nagy, és az ilyen sejtek szövettenyésztési módszerekkel történő tenyésztése reprodukálható eljárássá vált [lásd Tissue Culture, Academic Press, Kruse és Patterson (1973)]. Ilyen sejtvonalak például a VERO és a HeLa sejtek, a kínai hőrcsög ovárium (CHO) sejtvonal, a W13, BHK, COS-7 és MDCK sejtvonalak.

A továbbiakban megadott példák az *E. coli* felhasználást mutatják be a trp promóter rendszert alkalmazva, valamint a CHO sejtek felhasználását szemléltetik, olyan kifejező vektorokat alkalmazva, amelyek promóterként SV40 replikációs origót foglalnak magukban. Más prokariota vagy eukariota gazdasejt tenyésztetek alkalmazása azonban átlagos tudású szakember számára nem okoz problémát.

#### C) Alkalmazott módszerek

##### 1. Transzfekció

Ha gazdasejtként nagyméretű sejtfa nélküli sejteket használunk, a transzfekciót a kalcium-foszfát precipitációs módszerrel hajthatjuk végre a Graham és munkatársai [Virology, 52, 546 (1978)] által ismertetett mód-

szerrel. Azonban mag-injekció vagy protoplasztfúzió is alkalmazható.

Ha jelentős sejtfa konstrukciókat tartalmazó sejteket vagy prokariota sejteket alkalmazunk, az előnyös módszer a kalcium-kloridos eljárás [Cohen és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 69, 2110 (1972)].

##### 2. Vektor konstrukció

A kívánt kódoló és kontroll szekvenciát tartalmazó alkalmas vektorok konstrukciójára standard, önmagában ismert ligálási eljárások alkalmazhatók. Az izolált plazmidokat vagy DNS fragmentumokat hasítjuk, szabjuk és újra ligáljuk, a kívánt plazmidnak megfelelő formában.

Az alábbi következő példákban szereplő különféle, a szakmában szokásos rövid elnevezéssel említett reagensek és oldatok az alábbi összetételűek:

20×SSC: 3 mól/l (175 g/l) NaCl oldat  
0,3 mól/l (88 g/l) Na<sub>3</sub>-citrát×2H<sub>2</sub>O  
1 mól/l-es HCl-oldattal 7,0 pH-ra beállítva  
2×SSC a 20×SSC törzsoldat 10-szeres hígítás  
2×SDS minta pufferoldat:  
1,52 g trisz-bázis  
20 ml glicerin  
2,0 g nátrium-dodecil-szulfát (SDS)  
2,0 ml merkaptó-etanol  
1 mg brómfenolkék  
40 ml vízzel készített oldata  
N HCl-oldattal 6,8 pH-ra beállítva.

Egyéb SDS minta pufferoldatok a fenti törzsoldat megfelelő arányú hígításai  
borostyán (amber) szupresszor: az „amber” mutáció egy kodon mutációja egy olyan UAG kodonná, amely polipeptidlánc érés előtti bevégeződését okozza baktériumokban. A borostyán-szupresszor visszaszorítja ezt a nem kívánatos mutációt.

##### D) Példák

###### 1. Az M13mp8PABgIII konstrukciója t-PA mutagenézis céljára

A humán t-PA DNS-t pPADHFR-6 (más elnevezéssel pETPFR) és a pA25E10 plazmidokból állítottuk elő. E két t-PA plazmid előállítását a 093619 közzétett európai szabadalmi bejelentés leírása ismerteti.

A pA25E10 plazmid a t-PA gén utolsó 508 aminosavát és a 3' lefordítatlan tartomány 772 bázispárját kódoló szekvenciákat tartalmazza. Ezt a plazmidot a SacI és BglII enzimekkel emésztettük és így egy 744 bázispárt tartalmazó fragmentumot képeztünk, amelyet azután a szokásos gélelektroforézises módszerekkel különítettünk el. A fragmentum a t-PA 411–527 aminosavak kodonjait és a 3' lefordítatlan tartomány egy részét tartalmazza.

A pPADHFR-6 plazmid a t-PA teljes struktúrgénjét tartalmazza és magában foglalja a 3' lefordítatlan tartomány egy részét is. Ezt a plazmidot SacI és BglII

enzimmel kezeltük és így egy 1230 bázispárból álló fragmentumot kaptunk, amelyet azután elkülönítettünk. Ez a fragmentum a t-PA érett alakja első 410 aminosavának a kodonjait tartalmazza.

Ezeket a fragmentumokat azután a szokásos módszerekkel kapcsoltuk össze egymással, majd BglII enzimmel kezeltük a terméket. Egy 1974 bázispárból álló fragmentumot elkülönítettünk el, amely a teljes érett t-PA szekvencia és a 3' lefordíthatatlan tartomány egy részének kodonjait tartalmazza. Egy kétszálás M13mp8-at (Messing és munkatársai, Third Cleveland Symposium on Macromolecules Recombinant DNA, Ed. A. Walton, Elsevier, Amsterdam 1981., 143 1) BamHI enzimmel hasítottuk, majd kapcsoltuk a BglII-vel hasított t-PA-hoz, és így M13mp8PA-BglII keletkezett. Az

Natív aminosav	275	279
szekvencia	Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly	
Natív DNS		
szekvencia	G CCT CAG TTT CGC ATC AAA GGA G	
Primer 1B8		Gly
DNS szekvencia	G CCT CAG TTT CGT ATC AAA GGA G	
Primer 2C9		Glu
DNS szekvencia	G CCT CAG TTT GAA ATC AAA GGA G	
Primer 4A10		Gly Ile
DNS szekvencia	G TTT GGT ATC ATC GGA GGG CTC	
Primer 3A7		Gly Ile
DNS szekvencia	G CCT CAG TTT GGT ATC ATC GGA G	
Primer 4B3		Glu Ile
DNS szekvencia	G CCT CAG TTT GAA ATC ATC GGA G	

Az első két sorban a natív t-PA aminosav és gén szekvenciáját tüntetjük fel. A következőkben olyan primereket mutatunk be, amelyek a natív gén szekvenciától eltérő tripleteket tartalmaznak. A megfelelő aminosav-szubsztitúciót az aminosavat kódoló triplet fölött tüntetjük fel.

### 3. Hely-specifikus mutagenézis

A következőkben ismertetendő eljárást alkalmaztuk különböző, a szintetikus primerek mutált szekvenciáját tartalmazó t-PA klónok generálására. Az alkalmazott általános módszer Adelman és munkatársai eljárása [DNA, 2, 183 (1983)]. A klónok generálására alkalmazott eljárás vázlatát a 3. ábrán mutatjuk be. Az M13RF1B8-at, az M13RF2C9-et és az M13RF4A10-et olyan primerek alkalmazásával generáltuk, amelyek a bemutatott egyes aminosavaknál mutációkat tartalmaztak. Az M13RF4A10 egyes standardot, amely a 277 pozícióban tartalmazott mutációt, a 3A7 vagy 4B3 primerrel anellálva kaptuk az M13RF3A7-et, illetve az M13RF4B3-at. Ezen mutáns t-PA gének mindegyikéből származó tisztított M13 RF DNS-t készítettünk E. coli JM 101 sejtekből. Ezután a mutáns t-PA DNS szekvenciát tartalmazó DNS fragmentumokat használtuk expressziós vektorok készítésére a mutáns t-PA expressziójához.

50 ng szintetikus oligonukleotidot 30 percig 37 °C hőmérsékleten foszforileztünk, 10 µl 50 mmólos Tris-HCl (pH = 7,5) puffer, 10 mmól/l MgCl<sub>2</sub>, 10 mmól/l ditiotreitolt és 1 mmól ATP 8 egység T4 polinukleotid

M13mp8PABglII egyszálás és kétszálás (RF) alakjait az e fággal fertőzött E. coli JM 101 sejtekből elkülöníthetjük el. Az egyszálás alakot hely-specifikus mutagenéziséhez használtuk fel.

### 2. Primerek szintézise a hely-specifikus mutagenézishez

A humán t-PA struktúrgént hely-specifikus mutagenézissel úgy módosítottuk, hogy különböző pozíciókban aminosav-szubsztitúciókat tartalmazó t-PA-kat fejtszen ki. Szintetikus oligonukleotidokat állítottunk elő, például a szilárd fázisú foszfo-triészter módszerrel [Crea és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, (1978)]. A következő szintetikus primereket állítottuk elő a használatuk hely-specifikus mutagenézishez:

kinázt tartalmazó elegyében. Próbaként 400 ng szintetikus oligonukleotidot a fentiek szerint foszforileztünk, azzal a különbséggel, hogy az ATP-t 60 mCi ( $\gamma^{32}$ -P)-ATP-vel (300 µCi/mmól) helyettesítettünk, ami körülbelül  $50-60 \times 10^6$  cpm/400 ng 24mer-t eredményezett. Heteroduplex kialakítására 10 ng egyes szálú M13mp8PABglII-et 95 °C-ra melegítettünk (10 perc) majd lassan (30 perc alatt) szobahőfokra hűtöttük, 40 µl 10 mmólos Tris-HCl (pH = 7,5) puffer, 10 mmól/l MgCl<sub>2</sub>, 1 mmól/l ditiotreitolt 10 ng foszforilezett primert tartalmazó oldata és 50 ng EcoRI-emésztett M13mp8PABglIIRF nagy fragmentum elegyében. A primer meghosszabbítását 10 µl 2 mmól/l ATP-t, 0,25 mmól/l dGTP-t, dTTP, dCTP és dATP-t, 5 E. coli DNS polimeráz I nagy fragmentumot és 400 E T4 DNS ligázt tartalmazó ligáz puffer hozzáadásával indítottuk be. 1 órási, 12 °C-on végzett reakció után a reakcióelegyet E. coli JM101 (ATCC 33 876) sejtek transzformálására használtuk fel.

A transzformációt úgy végeztük, hogy 10 µl ligációs elegyet 200 µl JM101 sejttel elegyítettünk, majd az elegyet 30 percig jégen és 5 percig 37 °C-on inkubáltuk. Ezután 3,5 ml 2YT agart 55 °C hőmérsékleten elkevertünk 300 µl telített JM101 sejttel, 10 µl izopropil-1-tio-β-D-galaktóziddal (IPTG) (200 mmól) és 50 µl Xgal-lal, és a transzformált sejtek hozzáadása után LB-t antibiotikum nélkül tartalmazó 9 cm átmérőjű Petri-csészékre helyeztük.

Kiválasztottuk a színtelen plakkokat és átvittük egy

100 µl 2YT tápközeget tartalmazó mikrotiter csészébe. Az inokulált mikrotiter folyadékokat 15 cm átmérőjű LB agar lemezekre cseppentettük, 600 µl JM101 8 ml 2YT top agarral készült elegyével felülrétegeztük, és egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk. A keletkezett plakkokat 1 percig tartó fizikai kontaktussal átvittük egy nitrocellulóz lemezre. A nitrocellulóz lemezt 0,5 mól/l nátrium-hidroxiddal és 1,5 mól/l nátrium-kloriddal kezeltük 3 percen át, és kétszer 3 mól/l nátrium-klorid és 0,5 mól/l Tris HCl (pH = 7,5) elegyével mostuk 15 percen át. Ezután a mosást 2XSSC-vel folytatuk 15–15 percig. A prehibridizációs elegy 10 mmól/l Tris puffert (pH = 7,5), 5 mmól/l EDTA-t, 0,9 mól/l nátrium-kloridot, 1 x Denhardt, 0,5% NP40-et, (Nonidet P 40 detergens, Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo, USA), 100 µmól ATP-t, 1 mmól nátrium-pirofoszfátot és 50 µg/ml E. coli tRNS-t tartalmaz. Az 1 x Denhardt oldat literenként 200 mg Ficollt, 200 mg poli(vinil-pirrolidon)-t, 200 mg szarvasmarha szérum albumint (BSA, V, frakció) tartalmaz. A lemezt 80 °C-on, vákuumban 90 percen át inkubáltuk. A lemezt ezután 3 órán át 6 ml prehibridizációs folyadékkal inkubáltuk Petri-csészében, majd hozzáadtunk  $5 \times 10^6$  cpm jelzett primert és egy éjszakán át hibridizáltuk. A lemez szelektív mosását 0,4X SSC-vel 49 °C-on végeztük, és levegőn történő szárítás után a lemezt röntgen sugarakkal világitottuk meg. A pozitívan hibridizáló klónokat tovább analizáltuk didezoxi szekvenálással (lásd Aldeman korábban idézett munkáját).

#### 4. Vektorok konstruálása mutáns t-PA E. coli pXAP-PA18 3' Δx10trpR-ben történő expressziójához

A pXAPPA18 3'Δx10trpR plazmidot különböző mutáns t-PA DNS szekvenciák expressziója során történő felhasználás céljából konstruáltuk. A plazmid kialakításának általános sémáját a 4–8. ábrákon mutatjuk be. A kapott plazmidot a 8. ábra szemlélteti. A plazmid tartalmazza a trpR represszor gént és a pBR 322 DNS olyan szekvenciáinak delécióját, amelyek gátolják a plazmid amplifikációt. Ez a deléció, amely XAP delécióként ismert a pBR322-ben az Aval és PvuII restrikciós helyek között 641 bázispár hosszúságú szakasz eltávolítását jelenti [lásd Sutcliff, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, Vol. 43, 77 (1979) Cold Spring Harbor Press]. A trpO represszor gén kompenzálja a t-PA expresszióinak a megnövekedett kópiaszám következtében fellépő idő előtti derepresszióját. A pXAPPA18 3'Δx10trpR kialakítása során intermediér plazmid a pPA18, amelyet a 4. ábrán szemléltetett módon alakítottunk ki. Ez a plazmid tartalmazza a teljes pre-t-PA struktúr gént és az 5' és 3' nem-transzlált régiókat. A plazmid további jellemzője a t-PA génnel kapcsolatban lévő trp promoter és az ampicillin és tetraciklin rezisztenciáért felelős szekvenciák.

A pPA18 plazmid felépítéséhez négy plazmidot, nevezetesen a pFIFtrp69, a pHKY10, a ptPAtrp12 és a pPA25E10 plazmidokat használtuk. A pFIFtrp69 plazmidot Goeddel és munkatársai Nucleic Acids Res. 8, 4057 (1980) cikke ismerteti. A pHKY10 plazmid a 0036776 számon közrebocsátott európai szabadalmi bejelentésben szerepel. A ptPAtrp12 és pPA25E10

plazmidokkal Pennica és munkatársai foglalkoznak a Nature 301, 214 (1983) folyóiratban megjelent cikkükben és a 093619 számon közrebocsátott európai szabadalmi bejelentésben.

5 Általában a pFIFtrp69 plazmidot PstI és XbaI enzimekkel emésztve egy 1 fragmentumként jelölt, 950 bázispárhosszúságú fragmentumot hoztunk létre a 4. ábrán bemutatott módon. A ptPAtrp12 plazmidot XbaI és NarI enzimekkel emésztettük. Ebből a 4. ábrán 4 fragmentumként jelölt, 340 bázispárhosszúságú szekvenciát izoláltuk. A pPA25E10 plazmidot NarI és BglII enzimekkel emésztettük. Ebből a 4. ábrán 3 fragmentumként jelölt, 1604 bázispárhosszúságú fragmentumot izoláltuk. A pHKY10 plazmidot PstI és BglII enzimekkel emésztve egy, a 4. ábrán 2 fragmentumként jelölt, 2900 bázispárhosszúságú fragmentumot hoztunk létre. A négy fragmentumot ligáltuk, és ezt a DNS-t használtuk az E. coli sejtek pPA18-at eredményező transzformációjához.

20 A pPA18 plazmidot izoláltuk és Sau3A-val emésztettük, majd a DNS polimeráz I Klenow fragmentumával kezeltük a restrikciós hely feltöltése céljából. A nem-cirkularizált plazmidot SacI-el kezeltük és egy az 5B. ábrán 5 fragmentumként feltüntetett, 389 bázispárhosszúságú szekvenciát izoláltunk. A pPA18 plazmidot SacI és BamHI enzimekkel is emésztettük. Ebből a vektorból a 6 fragmentumot izoláltuk. A pBR 322 plazmidot [Boyer és munkatársai, Gene 2, 95 (1977)] EcoRI enzimmal, majd a DNS polimeráz I Klenow fragmentumával kezeltük. Ezt a nyitott végű DNS szekvenciát BamHI enzimmal kezeltük, és így egy az 5. ábrán 7 fragmentumként jelölt, 375 bázispárhosszúságú szekvenciához jutottunk. Az 5, 6 és 7 fragmentumokat ligáltuk, és ezt a készítményt használtuk az E. coli sejtek transzformálásához a pPA183'Δ plazmid előállítására céljából. Ez a plazmid megfelel a pPA18-nak, azzal az eltéréssel, hogy a t-PA gén 3' nem-transzlált régiójának egy része hiányzik.

40 A pPA183'Δ plazmid PstI és NarI enzimmal történő emésztésével a 6. ábrán 8 fragmentumként jelölt, 313 bázispárhosszúságú fragmentumhoz jutottunk, amely a 8–109 aminosavakat kódolja. A 9 szintetikus oligonukleotid fragmentum szekvenciája a következő:

5'

45 CTAGAATTATGCTTTATCAAGTTATTTGCATTAAT  
ACAGAATAGTTCAATAA 5'

50 Ezt a szintetikus DNS-t a 8 fragmentum PstI helyéhez ligáltuk, hogy így regeneráljuk az arginin kodont a 7. pozícióban és az érett t-PA molekula első hat aminosav kodonját. Ezen felül egy riboszóma kötőhelyet helyeztünk el 5' helyzetben a szintetikus N-terminális metionin kodonhoz képest, amely közvetlenül 5'-helyzetben van az érett t-PA aminosav kódoló szekvencia maradékához képest. Az oligonukleotid 5' vége egy XbaI restrikciós helyet tartalmaz. Így a 8 fragmentumot a 9 szintetikus oligonukleotid fragmentum jelenlétében ligáltuk, és az elegyet XbaI és NarI jelenlétében kezelve előállítottuk a 10 fragmentumot (6. ábra).

60 A pPA183'Δ plazmidot NarI és SacI enzimekkel

emésztve a 7A. ábrán 11 fragmentumként jelölt, 900 bázispárhosszúságú szekvenciát hoztuk létre. Ezt a plazmidot SacI és XbaI enzimekkel is emésztettük, és így a 7A. ábrán 12 fragmentumként jelölt vektor fragmentumhoz jutottunk. A 10, 11 és 12 fragmentumokat ligáltuk, és a ligátummal *E. coli*-t transzformáltunk, majd izoláltuk a pPA183'ΔX10 plazmidot. Az XAP deléció és trp represszor gént tartalmazó DNS szekvencia a pFMB/trpR-ből származik, melyet a 136 907 számon közrebocsátott európai szabadalmi bejelentés ismertet. Röviden, ezt a plazmidot három, szakember számára ismert plazmidból konstruálták. A phGH107 plazmid (022 242 számon közrebocsátott európai szabadalmi bejelentés) volt a forrása a lac indukálható promoterek, a ptrpR3-at [Roeder és munkatársai, *Molecular Genetics* 176, 361 (1979)] használták a trp represszor kódoló szekvenciájának forrásaként, és a 0068 693 számon közrebocsátott európai szabadalmi bejelentésben szereplő pFMB1-et használták az A24 törzsből származó FMD antigén kódoló szekvenciaként.

A trp represszor szekvencia előállítására céljából a ptrpR3-at HaeIII-vel kezeltük, és a 334 bázispárhosszúságú fragmentumot 6%-os akril-amid gélről izoláltuk, és az izolált fragmentumot a következő szekvenciájú 16-mer EcoRI linkerrel ligáltuk:

5'CCATAGAATTCTATGG.

A vektor gerincének és a lac promoterek előállítására céljából a phGH107-et először EcoRI-vel emésztettük, majd bakteriális alkáli foszfatázzal kezeltük. A lacUV5 promotert tartalmazó nagy vektor fragmentumot ezután T4 ligázzal a megszabott trpR plazmiddal ligáltuk, és a ligációs elegyet *E. coli*ba transzformáltuk. A transzformánsokból plazmid DNS-t izoláltunk, és meggyőződünk a kívánt, ptrpR/hGH 107-ként jelölt plazmid jelenlétéről [Messing és munkatársai, *Nucleic Acids Res.* 9, 309 (1981)].

A ptrpR/hGH107-et EcoRI-el részlegesen emésztettük, Klenow fragmentummal tompa véget hoztunk létre, PvuII-vel kezeltük a lac promoter/trp represszor operon (az 530 bp fragmentum) előállítására céljából. A pFMB1 részleges PvuII emésztése és a vektor fragmentum izolálása 6%-os poli(akril-amid)-on az expressziós vektornak az FMB kódoló szekvenciát a trp promoter kontrollja alatt tartalmazó vázához vezetett. A ptrpR/hGH107 fragmentumot összekevertük a pFMB1 PvuII emésztésével kapott eleggyel, és T4 ligázzal ligáltuk. A ligációs elegyet ezután *E. coli* 294 (ATCC 31 446) törzs transzformálására használtuk, és a transzformánsokat a plazmid DNS forrásaként alkalmaztuk. A kapott pFMB/trpR plazmidot miniscreenen azonosítottuk, és – az inszertum orientálásra céljából – AvaI-PvuII emésztéssel. A pFMB/trpR plazmidot NdeI és BamHI enzimekkel emésztettük. A trpR represszort – amely azonos a fentebb leírt módon a trpR3-ből előállított represszorról – tartalmazó fragmentumot izoláltuk. A pPA 183' X10 plazmidot NdeI és BamHI enzimekkel emésztettük. A fő vektor fragmentumot izoláltuk. Ezt a vektor fragmentumot és a pFMB trpR

represszor fragmentumát ligáltuk, és a DNS enzim elegyet *E. coli* transzformálására használtuk, majd a pXAPA183' X10trpR plazmidot izoláltuk, amint a 8. ábra mutatja.

#### 5 *E. coli* expressziós vektorok t-PA mutánsokhoz

A 8. ábra a pXAPA183' x10trpR vektort ábrázolja, amelyet t-PA és t-PA mutánsok expressziójához használtunk *E. coli*ban. Mint látható, a natív t-PA szerkezeti gén expresszióját a trp promotor kontrollálja. Felhívjuk a figyelmet az XbaI, NarI és SacI restrikciós helyekre. A pXAPA183' x10trpR plazmidot NarI és XbaI enzimekkel emésztettük. A 340 bázispárhosszúságú, a 8. ábrán 1. fragmentumként azonosított fragmentumot izoláltuk. A 8. ábrán 2 fragmentumként jelölt vektor fragmentumot úgy kaptuk, hogy a pXAPA183'Δx10trpR XbaI-el és SacI-el végzett emésztésével kapott nagy fragmentumot izoláltuk. A 3. fragmentumhoz úgy jutottunk, hogy a mutáns t-PA M13 klónok mindegyikének RF DNS-ét NarI és SacI enzimekkel emésztettük. A mutáns klónokat hely specifikus mutagenézissel állítottuk elő (3. ábra). Különböző mutáns t-PA-kat kifejező vektorokat úgy hoztunk létre, hogy az 1 és 2 fragmentumokat a megfelelő 3 fragmentumokkal ligáltuk, és ezeket használtuk az *E. coli* transzformálására, amelyből a következő *E. coli* mutáns t-PA expressziós vektorok izolálhatók voltak:

pXAPA18 3'Δx10trpR 1B8  
pXAPA18 3'Δx10trpR 2C9  
pXAPA18 3'Δx10trpR 4A10  
pXAPA18 3'Δx10trpR 3A7  
pXAPA18 3'Δx10trpR 4B3

Ezeket a plazmidokat és a pXAPA18 3'Δx10trpR vad típusú t-PA expressziós vektort használtuk az *E. coli* W 3110 fhuA<sup>-</sup> transzformálására.

Az *E. coli* W3110 fhuA<sup>-</sup> olyan T1 fág rezisztens baktérium, amelyet a fhuA génnel kapcsolatos DNS szekvenciákban levő deléció vagy inverzió jellemez (lásd a párhuzamosan benyújtott, 06/673 955 számú USA-beli szabadalmi bejelentést). Röviden, az *E. coli* W3110-et (ATCC 27 325) a Tn10 transzponálható elemet tartalmazó lambda bakteriofág transzdukálja. A Tn10 elem felelős a tetraciklin-rezisztenciáért. A Tn10-zel transzdukált W/3110 törzseket a fág infekcióval szembeni ellenállóképesség alapján szelektáljuk. A fág-rezisztens törzseket összegyűjtjük és a P1 bakteriofággal infektáljuk. A kapott lizátumot használjuk az *E. coli* AT 982 [Bukhari és munkatársai, *J. Bacteriology* 105, 844 (1971)] transzdukálásához. Az AT 982 törzs egy a fhuA génhez közel elhelyezkedő Dap mutációt tartalmaz. Ennek megfelelően, az AT 982 transzdukációja a P1 lizátummal és a tetraciklin-rezisztens, és a diamino pimelát (DAP) funkciót regeneráló transzdukánsok szelekciója azt mutatja, hogy a Tn10 transzpozon a fhuA génen belül helyezkedik el. A tetraciklin-rezisztens és regenerált DAP funkciót mutató törzsek a forrásai az *E. coli* W3110 P1 baktérium fággal történő transzdukciója DNS-ének. A tetraciklin-rezisztenciát és fág-rezisztenciát mutató transzdukált W3110 törzseket szelektáljuk. Ezeket a törzseket azután a fág

infekcióval szembeni rezisztencia és a tetraciklin-érzékenységre való megfordítása alapján szelektáljuk [Naloy és munkatársai, *J. Bacteriology* 145, 1110 (1981)]. A tetraciklin-érzékenység megjelenése a T1 fág infékciónal szembeni rezisztencia megtartásával társulva azt mutatja, hogy a *fhuA* génnel kapcsolatos DNS szekvencia vagy hiányzik deléción következtében, vagy irreverzibilis módon invertálódott. Az így kialakított törzseket *E. coli* W3110 *fhuA*<sup>-</sup>-nak jelöljük.

A Tn10 transzpozálható elemet tartalmazó fagot, amelyet a Tn10-nek a W3110-be történő beépítéséhez használtunk, a következőképpen konstruáltuk. A kiindulási anyag a lambda cI1857b 2210 am29 volt. Ez a fág az irodalomból ismert [Kleckner, *J. Mol. Biol.* 116, 125 (1977)], és a lambda három jól ismert mutánsából szokásos eljárásokkal készült. E lambda fág lizátumát az *E. coli* C600 (ATCC 23 724) borostyán szupresszoron készítettük, amelyet a szakember számára ismert technikával manipuláltunk, hogy a Tn10 transzpozont is hordozza [Lásd Kleckner és munkatársai, *J. Mol. Biol.* 116, 125 (1977)]. Ezt a lizátumot használtuk az *E. coli* C600 (lambda C1857) infektálására, amely egy borostyán szupresszort és a cI857 genotípust hordozó lambda profagot tartalmaz. Tetraciklin-rezisztens kolóniák lizátumait hoztuk létre hő indukcióval, a tetraciklin-rezisztens kolóniákat folyékony tápközegben először 32 °C hőmérsékleten, majd 42 °C hőmérsékleten 90 percen át növesztve. A lizátumot ezután *E. coli* C600-ra vittük fel és replikát készítettünk. Az *E. coli* C600-on készített plakkokról 32 °C hőmérsékleten *E. coli* C600-on és *E. coli* W3102 sup<sup>+</sup>-on (lambda imm434) replikát készítettünk, ahol az utóbbi a lambda imm434 heteroimmun makrofagot tartalmazta [Kleckner és munkatársai, *Genetics*, 90, 427 (1978)]. A heteroimmun törzsön megjelenő plakkokat tetraciklin lemezekre helyeztük. Az ezeken a lemezeken megjelenő plakkok képesek a tetraciklin-rezisztencia transzdukálására, és a fent ismertetett eljárás során felhasználhatók az *E. coli* W3110 *fhuA*<sup>-</sup> generálására.

A natív t-PA-t és mutáns t-PA-t 10 sejtenyészetből kaptuk, amelyet a megfelelő t-PA vagy mutáns t-PA plazmiddal transzformáltunk. Az expressziót triptofánhiányos táptalajjal indukáltuk.

#### 6. Expressziós vektorok t-PA mutánsokhoz emlős sejtekben

A pPADHFR-6 plazmidot (a 93 619 számon közrebocsátott európai szabadalmi bejelentés szerint pETPFR-nek is nevezik) a 9. ábrán mutatjuk be. A natív t-PA struktúr gén expresszióját az SV40 T-antigén korai promotere kontrollálja. Ez a promoter kontrollálja a DHFR gén expresszióját is. Érdemes figyelemmel lenni a BglII, BstXI és a BstEII restrikciós helyekre. A 9. ábrán 1 fragmentumként jelölt vektor fragmentumot úgy kaptuk, hogy a pPADHFR-6 BglII-vel és BstEII-vel végzett emésztésével kapott nagy fragmentumot izoláltuk. A 9. ábrán 2 fragmentumként jelölt fragmentumot úgy állítottuk elő, hogy egy a pPADHFR-6 BglII-el és BstXI-el végzett emésztésével kapott 400 bázispárhosszúságú t-PA fragmentumot izoláltunk.

Egy 1141 bázispárhosszúságú, a kívánt mutációkat

tartalmazó t-PA fragmentumot, melyet a 9. ábrán 3 fragmentumként jelölünk, úgy állítottuk elő, hogy a mutáns t-PA klónok mindegyikének RF DNS-ét BstXI-el és BstEII-vel emésztettük. Az 1 és 2 fragmentumokat ligáltuk az egyes 3 fragmentumokkal. A DNS elemeket használtuk az *E. coli* transzformálására. Mindegyik transzformánsból a megfelelő eukariota expressziós vektorokhoz jutottunk:

pPADHFR-6 1B8  
pPADHFR-6 2C9  
pPADHFR-6 4A10  
pPADHFR-6 3A7  
pPADHFR-6 4B3

Ezeket a plazmidokat valamint a nem-mutált pPADHFR-6 t-PA expressziós vektort használtuk a DHFR-hiányos CHO sejtek expressziójához, a Graham és munkatársai, *Virology* 52, 456 (1973) cikkben, illetve a 093 619 számon közrebocsátott európai szabadalmi bejelentésben foglaltak szerint. A natív és mutáns t-PA expressziót úgy erősítettük, hogy a tenyészeteket metotrexáttal növekvő koncentrációival kezeltük.

Például a pPADHFR-6 2C9 és a pPADHFR-6 1B8 plazmidokat a DHFR-hiányos CHO sejtek transzfektálására [Erlaub és Chasin, *PNAS* 77, 4216 (1980)] használtuk, Graham és munkatársai, *Virology* 52, 456 (1973) kalcium-foszfát precipitációs módszerét használva.

Mindegyik esetben a szelektív (a hipoxantint, glicint és timidint nem tartalmazó, azaz -HGT) közegben megjelenő kolóniákat összegyűjtöttük és -HGT közegben tovább növesztettük. Ezeket a sejteket 2x10<sup>5</sup> sejt/100 mm lemezekon 250 mm<sup>2</sup> metotrexátban (MTX) kezeltük, a plazmid szekvenciák amplifikációjának szelektálása céljából. Öt, a 250 mm<sup>2</sup> MTX-ben növekvő kolóniát extraháltunk a lemezről. Azt találtuk, hogy mind az öt t-PA-t szekretált a táptalajba. Ezeket a kolóniákat használtuk a további vizsgálatokhoz.

#### E) Vizsgálati módszerek

##### 1. Mutáns t-PA és t-PA tisztítás

A különböző, emlősök sejteiben a fenti módon növesztett t-PA-k a szövettanyészet közegébe ürültek. Az ilyen t-PA-kat tartalmazó közeget használtuk közvetlenül a különböző, a következőkben leírandó vizsgálatokhoz vagy vetettük alá a későbbiekben ismertetendő egy vagy több tisztítási lépésnek, a t-PA vagy mutáns t-PA tisztaságának növelése céljából.

A mutáns t-PA-t tartalmazó CHO sejtek mellől a táptalajokat kelatáló Sepharose-zal (Pharmacia) (10–20 ml gyanta/l táptalaj) szakaszosan extraháltuk. A gyanta cink-klorid aktiválást kapott [Rijken és munkatársai, *Biochim. és Biophys. Acta* 580, 140 (1979)]. A gyantát szűrőn gyűjtöttük össze. A gyantát egy oszlopba öntöttük, 0,02 mól nátrium-foszfátot (pH 8,0), 0,25 mól nátrium-kloridot, 0,01% Tween 80-at és 10 mg/liter aprotinint tartalmazó pufferrel mostuk. A t-PA-t ugyanezzel, de 50 mmól imidazolttal tartalmazó pufferrel eluáltuk. Az összegyűjtött t-PA-t 0,02 mólos

nátrium-foszfát (pH = 8), 0,25 mól NaCl és 0,01% Tween 80 elegyében dializáltuk, és egy lizin Sepharose gyantára vittük fel. [Radcliffe és munkatársai, Arch. Biochem. Biophys., 189, 185 (1978) és Allen és munkatársai, Thrombosis Hemostasis 45, 43 (1981)] vagy benzamidin Sepharose gyantára [Bykowska és munkatársai, Biochim. és Biophys. Acta, 703, 113 (1982)]. A cink-kelát gyantát röviden 0,02 mólos nátrium-foszfát (pH = 8), 1 mól NaCl és 0,01% Tween 80 elegyével mostuk, és a t-PA-t vagy mutáns t-PA-t ugyanezzel, de 0,5 mól arginint is tartalmazó pufferrel eluáltuk. A benzamidin Sepharose-t a dialízis pufferrel mostuk és 1 mól guanidint tartalmazó dialízis pufferrel eluáltuk. A keletkezett proteinek 90%-nál tisztábbak voltak SDS-PAGE analízis alapján. Az eddigi tisztítási technikákon felül immobilizált monoklonális ellenanyagok is használhatók [lásd Nielsen és munkatársai, EMBO J. 2, 115 (1983)].

### 2. SDS poli(akril-amid) gél elektroforézis (SDS-PAGE)

t-PA proteint vagy a t-PA mutáns proteineket tartalmazó táptalajok mintáit vákuumban koncentráltuk, és nátrium-dodecilszulfát (SDS) minta pufferrel hígítottuk. Ahol megjegyezzük, 10 mmól ditiotreitolt (DTT) adtunk a protein diszulfidok redukálása céljából. A szakaszos SDS elektroforézist 10%-os vagy 7–17%-os poli(akril-amid) gélek felhasználásával Laemmli módszerével hajtottuk végre [Laemmli, Nature 227, 680 (1970)]. A plazma minták analíziséhez 4–10%-os SDS poli(akril-amid) gradiens rezolváló géleket használtunk, Laemmli puffer rendszerével. Az SDS-PAGE analízisből a becsült molekulatömegeket (Mr) úgy kaptuk, hogy ismert molekulatömegű proteinek mozgékonyágával végeztünk összehasonlítást.

### 3. Buborék felszabadító rög lízis

A rekombináns (nem-mutáns) t-PA-t és mutáns t-PA-t (mutáns t-PA) megvizsgáltuk olyan szempontból, mennyire képesek a fibrin rögök lízisére. A vizsgálatot a buborék felszabadító lízis módszerrel végeztük.

Röviden, a trombint (Sigma Chemical Co.) feloldottuk desztillált vízben, körülbelül 1000 egység/ml mennyiségben. Ezt a törzsoldatot 1:30 arányban hígítottuk 0,06 mól monobázisos nátrium-foszfátot, 0,06 mól dibázisos nátrium-foszfátot, 200 mg/liter nátrium-azidot és 0,01% Tween 80-at tartalmazó vizsgálati pufferrel. A 0,5 ml hígított trombint (30–40 egység/ml) és 0,5–0,5 ml különböző koncentrációjú t-PA-t (16 ng/ml –  $1 \times 10^6$  ng/ml) kémcsövekbe töltve sorozatot készítettünk, és alkalmas kontrollokat vagy megfelelő hígítású ismeretlen mintákat készítettünk el. Ezen kívül előállítottunk egy másik kémcső sorozatot, amely 20  $\mu$ l plazminogént (1,0 mg/ml) és 1,0 ml fibrinogént (1 mg/ml) és 10  $\mu$ l 45

mesh-nél nagyobb lyukszámú lyukas üveg mikrogömböket (3M Company) tartalmazott.

A fenti reagenseket és kémcsöveket jégen tartottuk a vizsgálat végső lépéséig. 200  $\mu$ l trombin-t-PA-t vagy trombin-mutáns t-PA oldatokat adtunk egymás után a plazminogént, fibrinogént és mikrogömböket tartalmazó kémcsövekhez, az egészet 15 másodpercig megforgattuk és 37 °C-os vízfürdőre helyeztük. Mindegyik csőben 30 másodpercen belül rögök képződtek. Mértük a t-PA hozzáadása és a reakció végpontja között eltelt időt. Végpontként azt az időt definiáltuk, amikor a mikrogömbök a felszínre emelkedtek.

Egy adott minta trombolitikus aktivitásának mértékét egy standard t-PA görbére hivatkozva határoztuk meg. A fajlagos aktivitást a t-PA vagy mutáns t-PA radioimmun vizsgálattal meghatározott mennyisége alapján számítottuk.

### 4. In vitro rög lízis vizsgálat

A rekombináns t-PA-t és mutáns t-PA-t in vitro rög lízis rendszerben is vizsgáltuk.

Röviden, humán vért gyűjtöttünk, 3,13% nátrium-citrát antikoagulánst használva, és a sejt frakciót centrifugálással eltávolítottuk. 50  $\mu$ l 0,5 mólos  $\text{CaCl}_2$ -ot, 25  $\mu$ l szarvasmarha-trombint (100 egység/ml) és 10  $\mu$ l humán  $^{125}\text{I}$ -fibrinogént (100 000 cpm/10  $\mu$ l) adtunk a plazma minden ml-éhez. A plazma elegyet 4 mm belső átmérőjű szilikon csőbe vezetettük, majd 37 °C hőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk. A csövet 1 cm-es szegmensekre vágtuk, és a rögöket eltávolítottuk. A rögöket 0,3 mól nátrium-kloridból, 0,02 mól nátrium-citrátból (pH 5) és 0,01% Tween 80-ból álló pufferbe helyeztük. A rögöket négyeszer, egy-egy órán keresztül friss pufferrel öblítettük. Az utolsó öblítő folyadékban a radioaktivitás nem haladta meg a rögben lévő radioaktivitás körülbelül 10%-át. Minden rögöt 2,5 ml plazmába helyeztünk. Nulla pontként egy 250  $\mu$ l-es plazma mintát választottunk. A t-PA vagy mutáns t-PA mintáját 100  $\mu$ l-es térfogatba adtuk. 250  $\mu$ l-es mintákat vettünk 1, 2, 3 és 4 óránként, és a radiokativitást meghatároztuk. Párhuzamosan ml-enként 5, 10, 20 és 40 egység t-PA aktivitást tartalmazó standardokat futtattunk. A százalékos lízist minden egyes minta esetében a térfogat változások korrekciója után számoltuk.

### 5. Kromogén vizsgálatok

S-2288: A t-PA-t közvetlenül is mérhetjük, a Kabiféle szintetikus tripeptid kromogén szubsztrát felhasználásával (S-2288, Helena Laboratories, Beaumont, Texas). Ehhez a vizsgálathoz t-PA-t és 1 mmól S-2288-at és 0,01% Tween 80-at 37 °C-on 10 percen át inkubáltunk. A reakciót úgy állítottuk le, hogy 50  $\mu$ l jégecet adtunk 0,5 ml reakcióelegyhez. Az aktivitást a 405 nm-en mért abszorbanciából határoztuk meg, a

gyártó által standardizált következő egyenlet felhasználásával:

$$\text{aktivitás } 0,5 \text{ ml reakcióelegyben (IE, nemzetközi egység)} = \frac{\text{OD} \times 793,05 \frac{\text{IU} - \text{min}}{\text{OD}}}{\text{inkubálási idő}}$$

S-2251: A t-PA-val történő plazminogén aktiválást az S-2251-re specifikus Kabi-féle specifikus tripeptid kromogén szubsztrát (Helena Laboratories) felhasználásával mértük. A minta alikvot mennyiségét 0,1 ml 0,7 mg/ml-es plazminogénnel (0,05 mól Tris, pH = 7,4, amely 0,012 mól NaCl-ot tartalmaz) kevertük el, és a térfogatot 0,15 ml-re állítottuk be. Az elegyet 37 °C-on inkubáltuk 10 percen át, 0,35 ml S 2251-et (1,0 mmólos oldat a fenti pufferben) adtunk hozzá, és a reakciót 37 °C hőmérsékleten 5 vagy 10 percig folytattuk. Hozzáadtunk 50 µl jégcetetet a reakció leállítására, és mértük a 405 nm-en mutatkozó abszorpciót.

Az aktivitás mértékét úgy tettük kvantitatívvá, hogy összehasonlítóként egy, az S-2288 vizsgálat szerint standardizált rekombináns natív t-PA-t használtunk, és az eredményeket az azzal kapott eredményekkel vetettük össze. Erre kezdetben azért volt szükség, mert a 405 nm-en mért abszorpció napról napra változott, ahogy a plazminogén öregedett, és változott akkor is, ha különböző plazminogén és fibrinogén készítményeket használtunk. Ezt a változékonyságot később a lehető legnagyobb mértékben lecsökkentettük úgy, hogy óvatosan nagy mennyiségű humán plazminogént (glu-plazminogén) készítettünk, és az anyag alikvot mennyiségeit liofilizáltuk. Az alikvot mintákat -20 °C hőmérsékleten tároltuk. Használat előtt az újra oldott plazminogén preparátumokat legfeljebb 4 órán át 0 °C hőmérsékleten tároltuk. A t-PA aktivitás stimulálását fibrinogénnel úgy mértük, hogy a nagy koncentrációjú plazminogént tartalmazó oldatok aktivitását hasonló, de plazminogént nem tartalmazó elegyek aktivitásával hasonlítottuk össze. A fibrin oldhatatlansága következtében ebben a vizsgálatban fibrinogént használtunk. A nagy fibrinogén koncentrációkkal végzett stimulálás várhatóan hűen utánozza az oldhatatlan fibrintől várt stimulációt.

#### 6. In vivo inhibitor-komplex vizsgálat

A rekombináns és mutáns t-PA-t in vitro vizsgáltuk annak érdekében, hogy meghatározzuk a természetben előforduló t-PA inhibitorokkal szembeni reaktivitásukat. Általában a t-PA-t és mutáns t-PA-t jódoztuk <sup>125</sup>I izotóppal. Iodobeads (Pierce Chemical C.o.) felhasználásával. Így nagy (megközelítőleg 2×10<sup>6</sup> cpm/µg) fajlagos radioaktivitású t-PA-t vagy mutáns t-PA-t kaptunk. In vitro komplex képzéshez a radioaktív jelzett t-PA-t (1 µg) frissen vett, citrátozott humán teljes vérhez adtuk (500 µl). A mintákat szobahőmérsékleten inkubáltuk, és a reakciót úgy állítottuk le, hogy egy alikvot mintát 2%-os SDS-sel hígítottunk. A mintákat 4–10%-os poli(akril-amin) gradiens SDS-PAGE-vel vizsgáltuk. A komplexeket autoradiográfias úton detektáltuk.

#### 7. Fibrin megkötési vizsgálat

A fibrin megkötésére használt vizsgálat a Rijken és munkatársai [J. Biol. Chem. 257, 2920 (1982)] módosított változata. A vizsgálni kívánt t-PA mintát (500 ng) 0,05 mól Tris-t (pH = 7,4), 0,12 mól NaCl-ot, 0,01% Tween 80-at, 1 mg/ml humán szérium albumint és különböző koncentrációjú plazminogén-mentes fibrinogént (0, 0,1, 0,5 és 1,0 mg/ml) tartalmazó oldathoz

adjuk. A reakcióelegy végtérfogata 1 ml. A mintát 37 °C hőmérsékleten öt percig inkubáljuk, majd 1 egység trombint adunk hozzá. A mintákat egy órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A röögöt üvegbottal eltávolítjuk, és meghatározzuk a felülúszóban kötetlenül megmaradt t-PA mennyiségét. Az adatokat úgy ábrázoljuk, hogy a kötött t-PA százalékos mennyiségét tüntetjük fel a fibrinogén koncentráció függvényében (11. ábra).

#### 8. In vivo röög analízis

Collen és munkatársai [J. Clin. Invest. 71, 368 (1983)] in vivo röög lízis modelljét használtuk. 2,5–3 kg súlyú hím, új-zélandi fehér nyulakat ketaminnal altatunk, a nyaki eret katétereztük, és kis, kapcsolódó edényeket kapcsoltunk ehhez a területhez. A nyaki ér kb. 2 cm-es szakaszát reverzibilis kötésekkkel izoláltuk, a szegmens proximális végétől a disztális végig egy szálal vezettünk, a szegmenst átöblítettük egy konyhasós trombin oldattal, és feltöltöttük friss, <sup>125</sup>I humán fibrinogént tartalmazó nyúl vérrrel. 30 perc után meghatároztuk a vér áramlást a röögön keresztül. A t-PA i.v. infúziót a teljes dózis 10%-ával indítottuk. Az infúziót 4 órán át folytattuk. Az infúzió befejezése után 30 perccel a röögöket összegyűjtöttük és számoltuk. A radioaktivitást használtuk minőségi kontrollként. Mértük a radioaktivitást a vér mintákban, vizeletben, a tamponokban és fecskendőkből, annak megerősítésére, hogy a kezdeti röögben a radioaktivitás mennyiségét helyesen becsültük meg.

#### F) Vizsgálati eredmények

A 270–279. maradékoknál, a kettős szálú lizisációs helyeket a következő szekvenciával rendelkező t-PA mutánsokat fejeztük ki E. coliban és Chinese Hamster Ovary sejtekben:

35	natív	-Arg-Ile-Lys-Gly-Gly-	(RIKGG)
	1B8	-Gly-Ile-Lys-Gly-Gly-	(GIKGG)
	2C9	-Glu-Ile-Lys-Gly-Gly-	(EIKGG)

#### 1. Western foltok és zimográfia

A CHO sejtekben kifejezett EIKGG és GIKGG mutánsokat redukált és nem-redukált SDS-PAGE gélekből származó Western foltokkal analizáltuk. A natív, egyes szálú t-PA két, 52 000 és 50 000 dalton molekulatömegű sávként jelentkezik, a glikozilezésben mutatkozó különbség következtében. A nem-redukált SDS-PAGE-ből származó EIKGG mutáns egy nagyobb immunreaktív sávot mutatott, körülbelül 50 000 dalton molekulatömegnél. A nem-redukált SDS-PAGE-ből származó GIKGG mutáns azonban 55 000 dalton molekulatömegűnek mutatkozott. A GIKGG mutáns és a natív t-PA molekulatömege közötti különbség a natív t-PA-tól kissé eltérő konformáció vagy szénhidrát szerkezet jele lehet. A redukciót követő analízissel (a proteáz és Kringle láncok elválasztása után) a t-PA kisebb molekulatömege a protein arg 275 helyen történő hasadását mutatja. A redukált SDS-PAGE gélek zimográfjai az mutatták, hogy ezekben a mintákban a plazminogén lizisátor aktivitás a t-PA egyes szálú formájának immunreaktív sávjának molekulatömegénél (megközelítőleg) 60 000 volt. A kettős szálú forma körülbelül

30 000 dalton molekulatömegnek megfelelő mozgékonyt mutat.

A különböző 275 (XYZ) mutánsok, amelyeket a fentebb leírtak szerint állítottunk elő, egyetlen csíkként tűnnek fel mind redukált, mind nem redukált SDS-PAGE-ben, a Lys<sub>275</sub> kivételével, amely redukálás után kisebb molekulatömeget mutat. Ez a munkamenet azt demonstrálja, hogy – egyetlen kivétellel – a mutáns t-PA fehérjék egyláncú formái vannak jelen a transzformált sejtekből kapott tápközegben.

#### S-2251 vizsgálat

A natív és mutáns EIKGG t-PA S-2251 vizsgálatának analízis eredményeit az I. táblázatban mutatjuk be. Ezeket az értékeket a glu-plazminogén használata előtt kaptuk, annak érdekében, hogy a vizsgálat során a paraméterek változását csökkentjük. A természetben előforduló RIKGG t-PA szekvenciának az S 2288 vizsgálat alapján egy önkényes fajlagos aktivitást tulajdonítottunk a fibrinogén jelenlétében. Az EIKGG t-PA mutánsok mindegyikénél ezt a standard t-PA-t használtuk az eredmények normalizálásához.

Mint látható, az EIKGG t-PA mutáns, függetlenül a tisztítás fokától, az S-2251 vizsgálatban nagyobb fajlagos aktivitással rendelkezik, mint a rekombináns t-PA.

I. táblázat

Mutáció	Mutáns	S-2251+ Fibrinogén	S-2251- Fibrinogén	Fibrinogén stimuláció
RIKGG <sup>1</sup>	natív	(250 000) <sup>4</sup>	25 000	10,0
EIKGG <sup>1</sup>	2Cp	1 000 000	3400	290,0
EIKGG <sup>2</sup>	2C9	420 000	3100	134,0
EIKGG <sup>3</sup>	2C9	520 000	7000	74,0

- 1 cink-kelát lizin-agaróz felhasználásával tisztított
- 2 cink-kelát és benzamidin agaróz felhasználásával tisztított
- 3 tisztítás nélkül vizsgált
- 4 önkényesen hozzárendelt aktivitás

Az IA táblázatban közölt adatokat nagy-tisztaságú, liofilizált, glu-plazminogénnel végeztük. Egy jobban reprodukálható vizsgálat során azt találtuk, hogy az S-2251 vizsgálat során fibrinogén jelenlétében az EIKGG mutáns azonos aktivitású volt. Fibrinogén távollétében azonban a mutáns ebben az esetben is kevésbé volt aktív, mint a natív anyag (I. és IA táblázatok), ami nagyobb specificitást demonstrál.

IA táblázat

Mutáció	Mutáns	S-2251+ Fibrinogén	S-2251- Fibrinogén	Fibrinogén stimuláció
RIKGG <sup>1</sup>	natív	(250 000) <sup>2</sup>	17 600	14
EIKGG <sup>1</sup>	209	248 000	500	500

- 1 cink-kelát lizin-agaróz felhasználásával tisztított
- 2 önkényesen hozzárendelt aktivitás

A fentebb leírt további 275 (XYZ) mutánsokat is

átvizsgáltuk, és azt találtuk, hogy ezek az EIK mutánsokhoz hasonló aktivitást mutatnak.

#### 2. Buborék felszabadítási rögzítés és in vitro rögzítés vizsgálata

- 5 A buborék felszabadítási rögzítés vizsgálatot a rekombináns t-PA és a tisztított EIKGG t-PA mutáns fajlagos aktivitásának meghatározására használtuk. Mindegyik t-PA aktivitását a korábban ismertetett eljárásokkal határoztuk meg. A t-PA és EIKGG t-PA mutánsok koncentrációját radioimmunvizsgálattal határoztuk meg. E vizsgálatok eredményeit, beleértve a fajlagos aktivitást a II. táblázatban foglaljuk össze.

II. táblázat

Minta	I.D.	U/ml Aktivitás	Protein konc. mg/l	Fajlagos ak- tívítás
1	EIKGG*	8440	0,088	95 909
2	EIKGG**	7698	0,088	87 477
3	t-PA**	5640	0,088	64 090

1. fagyaszott – egyszer megolvastva
2. fagyaszott – négyszer megolvastva
- 25 \* cink-kelát és benzamidin-agaróz felhasználásával tisztított
- \*\* cink-kelát és lizin-agaróz felhasználásával tisztított

- 30 A buborék felszabadítási rögzítés azt mutatja, hogy a t-PA egyes szálú mutáns, közelebről az EIKGG t-PA mutáns 50%-kal nagyobb fajlagos aktivitással rendelkezik, mint a rekombináns t-PA. Mint látható, a megismételt fagyasztás és megolvastás az EIKGG t-PA mutáns fajlagos aktivitásának kis csökkenéséhez vezetett. Azonban a mutáns t-PA ebben az esetben is megőrizte a rekombináns t-PA-ét meghaladó fajlagos aktivitását.

- 35 A vizsgálati reprodukálhatóság határain belül, és finomabb technikákat is alkalmazva [lásd Carlson és munkatársai: Anal. Biochem. 168, 428 (1988)], a többi 275. (XYZ) mutáns az EIK mutánsokhoz hasonló rögzítés aktivitást mutat a CIK (C<sub>275</sub> t-PA) kivételével, amely kisebb aktivitást mutat. Ebben a vizsgálatban az EIK (E<sub>275</sub> t-PA) mintegy a vad típusú (RIK) t-PA-val ekvivalens.

#### 3. In vivo inhibitor-komplex vizsgálata

- 45 A proteázok plazma proteáz inhibitorokkal történő inaktiválása jól ismert és tanulmányozott mechanizmus szérum proteázok inaktiválására. A keletkezett komplexek denaturálással szemben stabilak, és SDS-PAGE elektroforézissel vizsgálhatók. Ebben az eljárásban radioaktív-jelzett t-PA-t adunk plazmához vagy teljes vérhez, és a mintát 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A mintát SDS-PAGE elektroforézissel, majd autoradiográfián vizsgáljuk. A radioaktivitásnak a szabad t-PA-nál nagyobb Mr-nél történő detektálása a képződött t-PA proteáz inhibitor komplex mennyiségére jellemző. Patkány vérben analizálva azt találtuk, hogy a t-PA lassan 200 000-nél nagyobb molekulatömegű komplexeket képzett. Néhány órás inkubálás után a radioaktivitásnak több mint 70%-a ilyen komplexekben volt detektálható. Ezzel szemben, a mutáns t-PA nem hozott létre ilyen komplexeket; az autoradiográfi-

ásan detektált radioaktivitás fő tömege a szabad, nem-lízisált enzim pozíciójában maradt. Hasonló analízist humán vérrel végezve (10. ábra) a t-PA szintén létrehozott ilyen komplexeket, de 100 000 és 20 000 közötti molekulatömegű komplexeket is képzett. Ugyanúgy, mint a patkányvér esetében, a mutáns t-PA lényegesen kevesebb 200 000-nél nagyobb molekulatömegű komplexet hozott létre. A 100 000 és 200 000 közötti molekulatömegű proteáz komplexek még jelen voltak. Ezek az eredmények arra mutatnak, hogy a mutáns nem inlízisálják a proteináz inhibitorok, amelyek 200 000-nél nagyobb molekulatömeggel képeznek komplexeket. A 100 000 és 200 000 közötti tartományban az egyes specierek között eltéréseket figyeltünk meg mind a t-PA, mind a mutáns t-PA esetében.

#### 4. Fibrin kötés

Korábban azt közölték, hogy a t-PA egyes szálú és kettős szálú formái megközelítőleg azonos affinitást mutatnak fibrinnel szemben [Rijken és munkatársai, J. Biol. Chem. 257, 2920 (1982)]. Az itt leírt vizsgálatban azonban azt találtuk, hogy az egyes szálú t-PA forma lényegesen nagyobb affinitást mutatott a fibrinnel szemben, mint a kettős szálú forma (11. ábra).

Az összes többi 275(XYZ) mutáns az EIK-hoz hasonló aktivitást mutat a fibrin-kötési vizsgálatban. Meghatároztuk, hogy a fentiek szerint előállított GIK (G275-t-PA) mutáns kisebb fajlagos aktivitást mutat ebben a vizsgálatban az RIK-hoz viszonyítva; ez vélhetően egy második, megelőző mutáció (a 261. aminosavnál *lys* helyett *tyr*) feltételezett jelenléte miatti konformációs rendellenességnek tulajdonítható. A CIK és KIK mutánsok szintén kisebb aktivitásokat mutatnak, mint a vad típus (RIK), ez vélhetően bizonyos hibás feltekeredésnek és bizonyos kettős láncú forma jelenlétének tulajdonítható.

#### 5. *In vivo* rög lízis

A 12. ábra a relatív dózis-válasz görbéket mutatja t-PA (o) és az EIK mutáns (o) esetében. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM értékeként adjuk meg, egy csoportban 5 nyúl adatait értékelve. Megmértük a távolságot a két görbe között az 50%-os lízis pontnál, és a t-PA EIK formájának potenciálját 2,4-szer nagyobbra becsültük, mint a nem-mutált formáét (RIK). A statisztikusan szignifikáns különbséget 0,25 mg/kg dózisonál értük el ( $p < 0,01$ ).

A fentiekből világosan kitűnik, hogy szokásos vídőanyagokkal és adalékanyagokkal összekeverve a találmány szerinti vegyületek gyógyszerként alkalmazhatók.

#### G) Következtetések

A fenti eredmények azt mutatják, hogy a t-PA 275. maradékánál bekövetkezett mutáció hatékonyabb lehet, mint a természetes forma két külön ok miatt:

1. Megnövekedett specificitás: a t-PA funkció vizsgálatai aktívabb/specifikusabb proteinre mutatnak.
2. Lecsökkent in vivo plazma inhibitor kötés: az ilyen mutánsok lecsökkent in vivo gátlása a bizonyos proteáz inhibitorokkal történő inlízisálás csökkenésére utal. Ez meg kell hogy engedje az aktív, nem-komplexált formában levő t-PA keringését, ezáltal

lehetővé téve, hogy a megnövekedett funkcionális t-PA feloldjon egy vérrögöt.

A t-PA egyes szálú formájának enzimikus tulajdonságai tekintetében a tudományos irodalom ellentmondásos. A t-PA funkciójának jobb megértése érdekében homológ proteineket lehet megvizsgálni. Részletes vizsgálatok folytak a szerin proteázok közül a tripszinnel és kimotripszinnel. A t-PA proteáz tartománya igen hasonló ezekhez a proteinekhez, és feltehetően hasonló módon funkcionál. A tripszin és kimotripszin funkcióján alapuló mechanizmus alapján az lenne várható, hogy a t-PA 275 argininjénél a hasadás megakadályozása csak a proteáz tartomány funkcionális jellemzőit befolyásolja. Ezért meglepő a mutánsok megnövekedett fibrin affinitása.

Függetlenül a szóbanforgó mechanizmus(ok)tól (magnövekedett specificitás, a proteáz inhibitor kötés hiánya, megnövekedett fibrin affinitás vagy ezek kombinációja), amikor egy mutáns esetében *in vivo* vizsgáltuk a létrejött, az eret elzáró vérrög lízisét, azt találtuk, hogy a mutáns körülbelül 2,5-szer aktívabb volt, mint a természetes szekvenciájú t-PA. Mint korábban részletesen tárgyaltuk, a t-PA egyes szálú formája a rög helyén kettős szálú formává alakult. Egy ilyen átalakulás tönkretenne minden az egyes szálú formával kapcsolatos előnyt. Csak a mutáns t-PA képes arra, hogy miközben a fiziológiás proteázok kettős szálú formájává alakítják, megőrizze a korábbi előnyöket a rög képződésének helyén.

A találmány ismertetése során a találmány előnyös megvalósítási módjait írtuk le. Szakember számára azonban nyilvánvaló, hogy számos változtatásra van lehetőség, amelyek nem érintik a találmány lényegét és így szintén az oltalmi körbe esnek.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás DNS szekvencia előállítására, amely olyan egyes szálú humán szöveti plazminogén lízisátor mutáns kódol, amelynek a 270–279. aminosav-tartományában legalább a 275. helyen az eredeti szekvenciától eltérő aminosav áll, *azzal jellemezve*, hogy

a 2. ábra 1–527 aminosavait kódoló, de a 270–279. aminosavnak megfelelő tartományban legalább a 275. aminosavnak megfelelő helyen a 2. ábrán feltüntetettől eltérő DNS szekvenciát, amely adott esetben valamely szignál-peptidet kódoló szekvenciával, továbbá 3' és 5' nem transzlatált területet jelentő szekvenciával van kiegészítve, önmagában ismert kémiai és/vagy biotechnológiai módszerekkel alakítjuk ki, előnyösen a természetes t-PA-t kódoló, 2. ábra szerinti szekvenciának a 270–279. aminosavnak megfelelő tartományában legalább a 275. aminosavnak megfelelő CGC kódot pontmutációval cseréljük ki.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás DNS szekvencia előállítására, amely olyan egyes szálú humán szöveti plazminogén lízisátor mutáns kódol, amelyben a 275. helyzetet glicin vagy glutaminsav foglalja el, *azzal jellemezve*, hogy a 275. aminosavnak megfelelő helyen

CGC helyett valamely glicint vagy glutaminsavat kódoló tripletet tartalmazó DNS szekvenciát önmagában ismert kémiai és/vagy biotechnológiai módszerekkel, előnyösen pontmutációval alakítjuk ki.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a 2. ábra -35- -1 aminosavainak megfelelő szignálpeptidet kódoló szekvenciával kiegészített DNS szekvenciát önmagában ismert kémiai és/vagy biotechnológiai módszerekkel, előnyösen pontmutációval alakítjuk ki.

4. Az 1–3 igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a 2. ábra 3' és 5' nem transzlatált területet jelentő szekvenciáival kiegészített DNS szekvenciát önmagában ismert kémiai és/vagy biotechnológiai módszerekkel, előnyösen pontmutációval alakítjuk ki.

5. Eljárás vektor előállítására, amely egyes szálú humán szöveti plazminogén lízisátor mutáns kódoló DNS szekvenciát foglal magában kifejezésre alkalmas formában, ahol a nevezett mutánsnak a 270–279. helyzetű tartományában legalább a 275. helyzetet valamely más, az eredetitől eltérő aminosav foglalja el, *azzal jellemezve*, hogy valamely, 1–4. igénypontok bármelyike szerint előállított szekvenciát

- a) megfelelő operátor rendszerrel együtt valamely vektorba iktatunk, vagy
- b) valamely megfelelő operátor rendszerrel bíró vektorba iktatunk.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás vektor előállítására, mely egyes szálú humán szöveti plazminogén lízisátor mutáns kódoló DNS szekvenciát foglal magában kifejezésre alkalmas formában, ahol a nevezett mutánsban a 275. helyzetet glicin vagy glutaminsav foglalja el, *azzal jellemezve*, hogy valamely, a 2. igénypont szerint előállított DNS szekvenciát

- a) megfelelő operátor rendszerrel együtt valamely vektorba iktatunk, vagy
- b) valamely megfelelő operátor rendszerrel bíró vektorba iktatunk.

7. Eljárás prokarióta vagy állati sejt- vagy szövettenyészet eredetű transzformánsok előállítására, amelyek egyes szálú humán szöveti plazminogén lízisátor mutáns kifejezésére képesek, ahol a nevezett mutánsnak a 270–279. helyzetű tartományában legalább a 275. helyzetet valamely az eredetitől eltérő aminosav foglalja el, *azzal jellemezve*, hogy valamely prokarióta organizmust vagy valamely állati sejt- vagy szövettenyészet sejtjeit valamely 5. vagy 6. igénypont szerint előállított vektorral transzformálunk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás prokarióta vagy állati sejt- vagy szövettenyészet eredetű transzformánsok előállítására, amelyek egyes szálú humán szöveti plazminogén lízisátor mutáns kifejezésére képesek, ahol a nevezett mutánsban a 275. helyzetet glicin vagy glutaminsav foglalja el, *azzal jellemezve*, hogy valamely prokarióta organizmust vagy valamely állati sejt- vagy szövettenyészet sejtjeit valamely 6. igénypont szerint előállított vektorral transzformálunk.

9. A 7. vagy 8. igénypont szerinti eljárás prokarióta eredetű transzformánsok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely prokarióta organizmust transzformálunk.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás E.coli transzformánsok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely E.coli törzset transzformálunk.

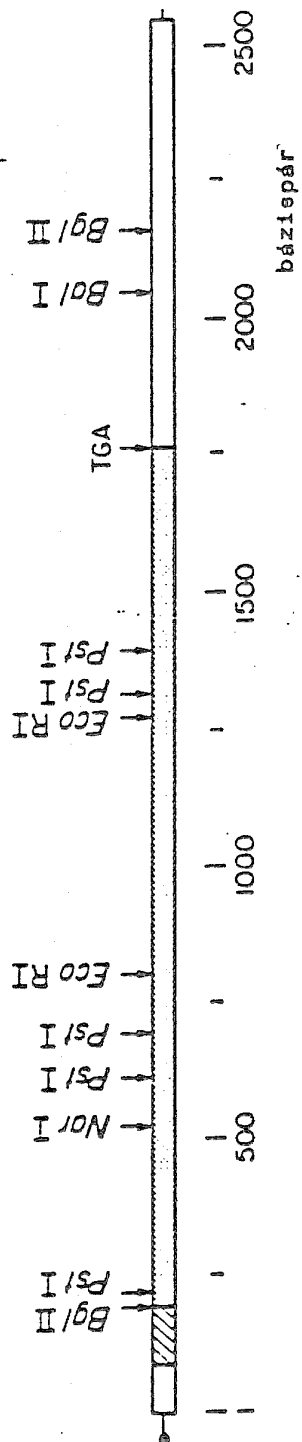
11. A 7. vagy 8. igénypont szerinti eljárás állati sejt- vagy szövettenyészet eredetű transzformánsok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely állati sejt- vagy szövettenyészet sejtjeit transzformáljuk.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás kínai hörcsög petefészkek (CHO) eredetű transzformánsok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy CHO sejttenyészetet transzformálunk.

13. Eljárás egyes szálú humán szöveti plazminogén lízisátor mutáns előállítására, amelynek a 270–279. helyzetű tartományában legalább a 275. helyzetet egy, az eredetitől eltérő aminosav foglalja el, *azzal jellemezve*, hogy valamely, 7–12. igénypontok bármelyike szerint előállított prokarióta vagy állati sejt- vagy szövettenyészet eredetű transzformáns megfelelő tápközegben tenyésztünk, a tenyészetből a szöveti plazminogén lízisátor mutáns elkülönítjük, és kívánt esetben a szignál szekvenciát lehasítjuk.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás egyes szálú szöveti plazminogén lízisátor mutáns előállítására, amelyben a 275. helyzetet glicin vagy glutaminsav foglalja el, *azzal jellemezve*, hogy valamely, a 8. igénypont szerint előállított transzformáns tenyésztünk.

15. Eljárás szöveti plazminogén lízisátor hatású gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely 13. vagy 14. igénypont szerint előállított egyes szálú szöveti plazminogén aktivátor mutáns valamely gyógyászati elfogadható hordozóval és/vagy segédanyagokkal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítunk.



1. ábra



2B. ábra

70  
GLN ALA LEU TYR PHE SER ASP PHE VAL CYS GLN CYS PRO GLU GLY  
CAG GCC CTG TAC TTC TCA GAT TTC GTG TGC CAG TGC CCC GAA GGA

80 90  
PHE ALA GLY LYS CYS CYS GLU ILE ASP THR ARG ALA THR CYS TYR  
TTT GCT GGG AAG TGC TGT GAA ATA GAT ACC AGG GCC ACG TGC TAC

100  
GLU ASP GLN GLY ILE SER TYR ARG GLY THR TRP SER THR ALA GLU  
GAG GAC CAG GGC ATC AGC TAC AGG GGC ACG TGG AGC ACA GCG GAG

110 120  
SER GLY ALA GLU CYS THR ASN TRP ASN SER SER ALA LEU ALA GLN  
AGT GGC GCC GAG TGC ACC AAC TGG AAC AGC AGC GCG TTG GCC CAG

130  
LYS PRO TYR SER GLY ARG ARG PRO ASP ALA ILE ARG LEU GLY LEU  
AAG CCC TAC AGC GGG CGG AGG CCA GAC GCC ATC AGG CTG GGC CTG

140 150  
GLY ASN HIS ASN TYR CYS ARG ASN PRO ASP ARG ASP SER LYS PRO  
GGG AAC CAC AAC TAC TGC AGA AAC CCA GAT CGA GAC TCA AAG CCC

160  
TRP CYS TYR VAL PHE LYS ALA GLY LYS TYR SER SER GLU PHE CYS  
TGG TGC TAC GTC TTT AAG GCG GGG AAG TAC AGC TCA GAG TTC TGC

170 180  
SER THR PRO ALA CYS SER GLU GLY ASN SER ASP CYS TYR PHE GLY  
AGC ACC CCT GCC TGC TCT GAG GGA AAC AGT GAC TGC TAC TTT GGG

2C. ábra

190  
ASN GLY SER ALA TYR ARG GLY THR HIS SER LEU THR GLU SER GLY  
AAT GGG TCA GCC TAC CGT GGC ACG CAC AGC CTC ACC GAG TCG GGT

200  
ALA SER CYS LEU PRO TRP ASN SER MET ILE LEU ILE GLY LYS VAL  
GCC TCC TGC CTC CCG TGG AAT TCC ATG ATC CTG ATA GGC AAG GTT

210  
220  
TYR THR ALA GLN ASN PRO SER ALA GLN ALA LEU GLY LEU GLY LYS  
TAC ACA GCA CAG AAC CCC AGT GCC CAG GCA CTG GGC CTG GGC AAA

230  
HIS ASN TYR CYS ARG ASN PRO ASP GLY ASP ALA LYS PRO TRP CYS  
CAT AAT TAC TGC CGG AAT CCT GAT GGG GAT GCC AAG CCC TGG TGC

240  
250  
HIS VAL LEU LYS ASN ARG ARG LEU THR TRP GLU TYR CYS ASP VAL  
CAC GTG CTG AAG AAC CGC AGG CTG ACG TGG GAG TAC TGT GAT GTG

260  
PRO SER CYS SER THR CYS GLY LEU ARG GLN TYR SER GLN PRO GLN  
CCC TCC TGC TCC ACC TGC GGC CTG AGA CAG TAC AGC CAG CCT CAG

270  
280  
PHE ARG ILE LYS GLY GLY LEU PHE ALA ASP ILE ALA SER HIS PRO  
TTT CGC ATC AAA GGA GGG CTC TTC GCC GAC ATC GCC TCC CAC CCC

290  
TRP GLN ALA ALA ILE PHE ALA LYS HIS ARG ARG SER PRO GLY GLU  
TGG CAG GCT GCC ATC TTT GCC AAG CAC AGG AGG TCG CCC GGA GAG

300

2D. ábra

310  
ARG PHE LEU CYS GLY GLY ILE LEU ILE SER SER CYS TRP ILE LEU  
CGG TTC CTG TGC GGG GGC ATA CTC ATC AGC TCC TGC TGG ATT CTC

320  
SER ALA ALA HIS CYS PHE GLN GLU ARG PHE PRO PRO HIS HIS LEU  
TCT GCC GCC CAC TGC TTC CAG GAG AGG TTT CCG CCC CAC CAC CTG

340  
THR VAL ILE LEU GLY ARG THR TYR ARG VAL VAL PRO GLY GLU GLU  
ACG GTG ATC TTG GGC AGA ACA TAC CGG GTG GTC CCT GGC GAG GAG

350  
GLU GLN LYS PHE GLU VAL GLU LYS TYR ILE VAL HIS LYS GLU PHE  
GAG CAG AAA TTT GAA GTC GAA AAA TAC ATT GTC CAT AAG GAA TTC

370  
ASP ASP ASP THR TYR ASP ASN ASP ILE ALA LEU LEU GLN LEU LYS  
GAT GAT GAC ACT TAC GAC AAT GAC ATT GCG CTG CTG CAG CTG AAA

380  
SER ASP SER SER ARG CYS ALA GLN GLU SER SER VAL VAL ARG THR  
TCG GAT TCG TCC CGC TGT GCC CAG GAG AGC AGC GTG GTC CGC ACT

400  
VAL CYS LEU PRO PRO ALA ASP LEU GLN LEU PRO ASP TRP THR GLU  
GTG TGC CTT CCC CCG GCG GAC CTG CAG CTG CCG GAC TGG ACG GAG

410  
CYS GLU LEU SER GLY TYR GLY LYS HIS GLU ALA LEU SER PRO PHE  
TGT GAG CTC TCC GGC TAC GGC AAG CAT GAG GCC TTG TCT CCT TTC

420

2E. abra

430  
TYR SER GLU ARG LEU LYS GLU ALA HIS VAL ARG LEU TYR PRO SER  
TAT TCG GAG CGG CTG AAG GAG GCT CAT GTC AGA CTG TAC CCA TCC

440 450  
SER ARG CYS THR SER GLN HIS LEU LEU ASN ARG THR VAL THR ASP  
AGC CGC TGC ACA TCA CAA CAT TTA CTT AAC AGA ACA GTC ACC GAC

460  
ASN MET LEU CYS ALA GLY ASP THR ARG SER GLY GLY PRO GLN ALA  
AAC ATG CTG TGT GCT GGA GAC ACT CGG AGC GGC GGG CCC CAG GCA

470 480  
ASN LEU HIS ASP ALA CYS GLN GLY ASP SER GLY GLY PRO LEU VAL  
AAC TTG CAC GAC GCC TGC CAG GGC GAT TCG GGA GGC CCC CTG GTG

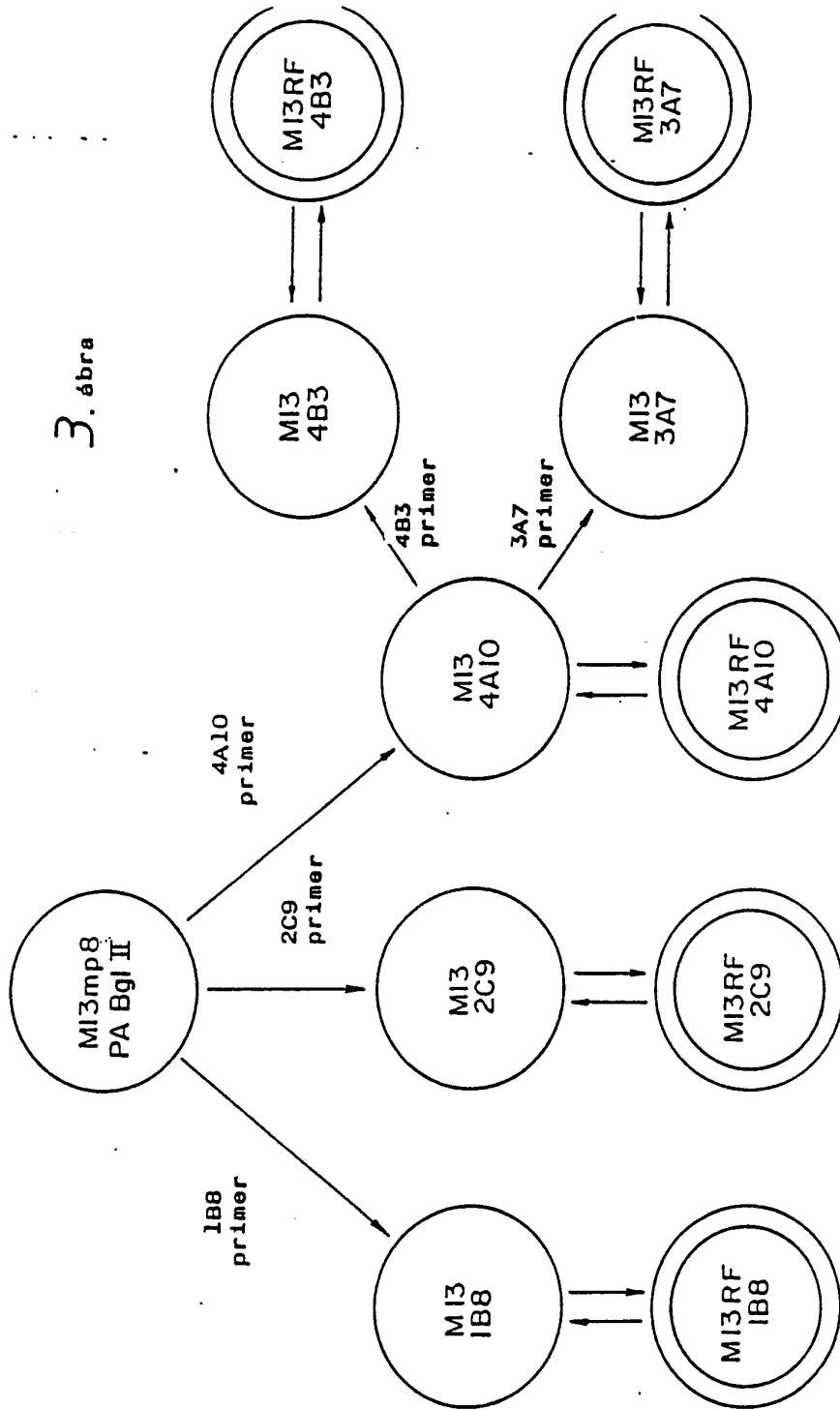
490  
CYS LEU ASN ASP GLY ARG MET THR LEU VAL GLY ILE ILE SER TRP  
TGT CTG AAC GAT GGC CGC ATG ACT TTG GTG GGC ATC ATC AGC TGG

500 510  
GLY LEU GLY CYS GLY GLN LYS ASP VAL PRO GLY VAL TYR THR LYS  
GGC CTG GGC TGT GGA CAG AAG GAT GTC CCG GGT GTG TAC ACA AAG

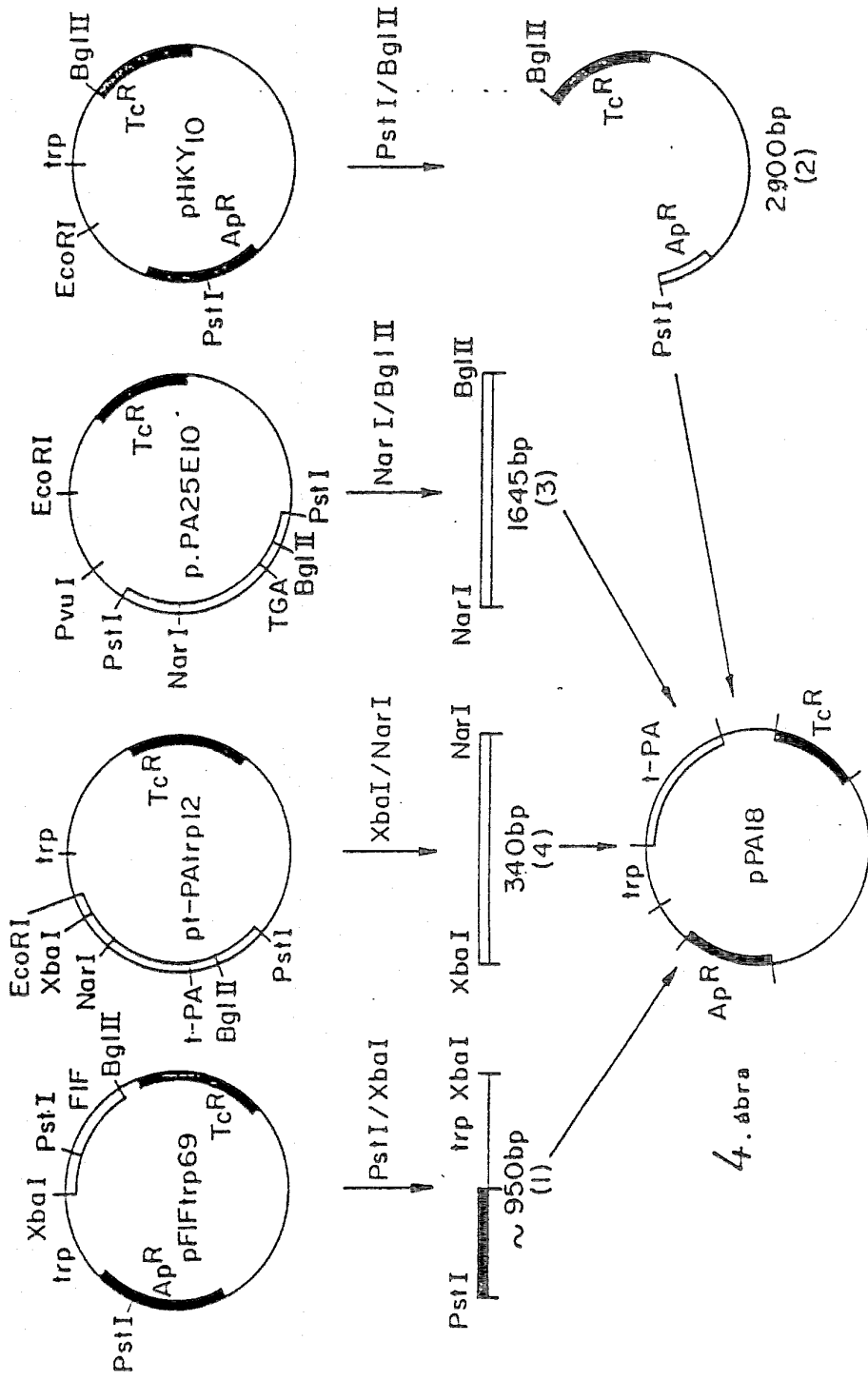
520 527  
VAL THR ASN TYR LEU ASP TRP ILE ARG ASP ASN MET ARG PRO DP  
GTT ACC AAC TAC CTA GAC TGG ATT CGT GAC AAC ATG CGA CCG TGA

2F. abra

CCAGGAACACCCGACTCCTCAAAGCAAATGAGATCCCGCCTCTTCTTCTTCAGAAGACA  
CTGCAAAGGCGCAGTGCTTCTCTACAGACTTCTCCAGACCCACCACACCGCAGAAGCGGG  
ACGAGACCCTACAGGGAGAGGGAAGAGTGCATTTTCCAGATACTTCCCATTTTGGAAGT  
TTTCAGGACTTGGTCTGATTTTCAAGATACTCTGTGAGATGGGAAGACATGAATGCACACT  
AGCCTCTCCAGGAATGCCTCCTCCCTGGGCAGAAGTGGCCATGCCACCCTGTTTTCGCTA  
AAGCCCAACCTCCTGACCTGTACCCGTGAGCAGCTTTGGAAACAGGACCACAAAATGAA  
AGCATGTCTCAATAGTAAAAGAAACAAGAGATCTTTCAGGAAAGACGGATTGCATTAGAA  
ATAGACAGTATATTTATAGTACAAGGGCCAGCAGGGCTCAAAGTTGGGGCAGGCTGGC  
TGGCCCGTCATGTTCTCAAAGCGCCCTTGACGTCAAGTCTCCTTCCCCTTTCCCACT  
CCCTGGCTCTCAGAAGGTATTCCTTTTGAGTACAGTGTGTAAGTGTAATCCTTTTTCT  
TTATAAAGTTTAGAGTAGCATGAGAGAATTGTATCATTGAACTAGGCTTCAGCATA  
TTTATAGCGATCCATCGTTAGTTTTACTTTCCGTTGCCACAACCTGTTTTATACCGTA  
CTTAATAAATTCGGATATATTTTTTTCACAGTTTTTTTCCAAAAAAAAAAAAA

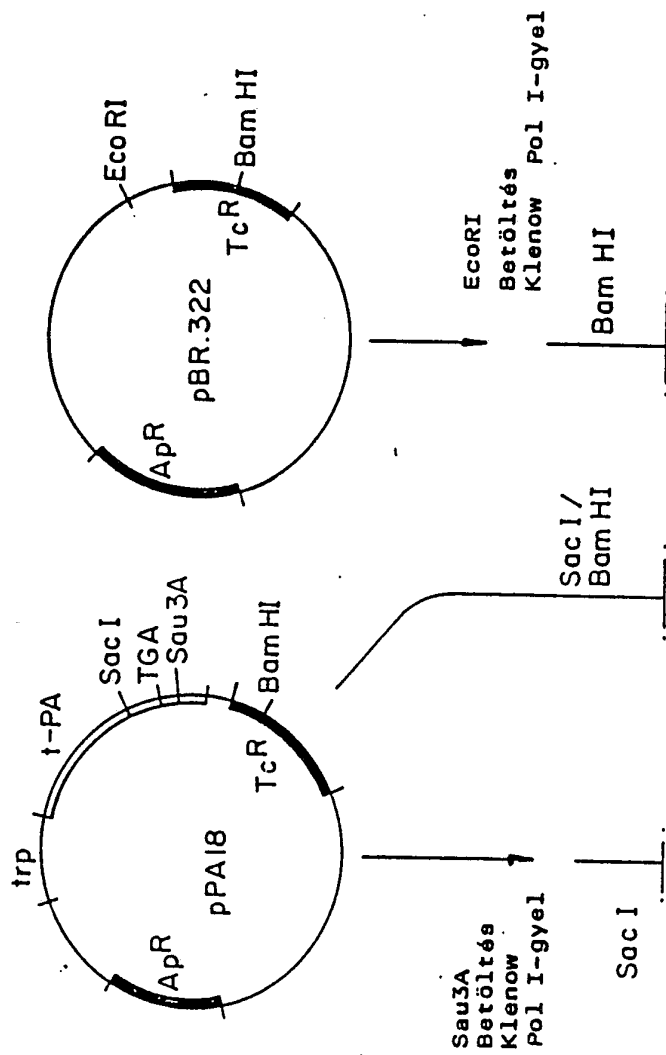


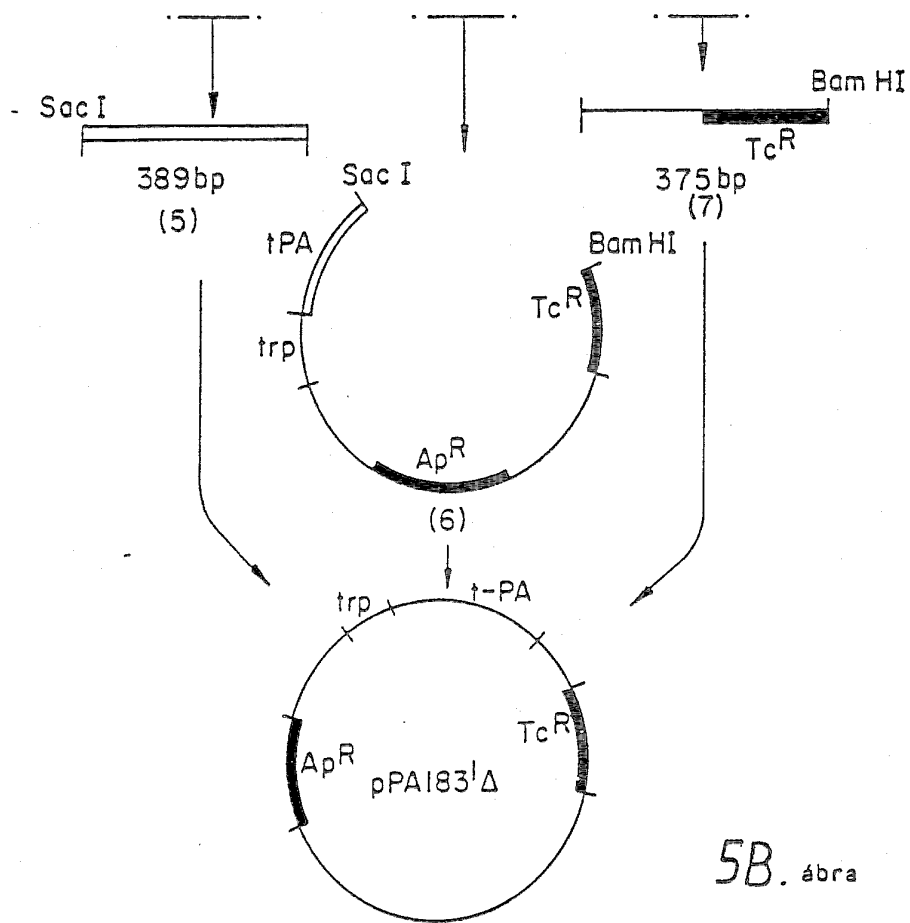
3. ábra



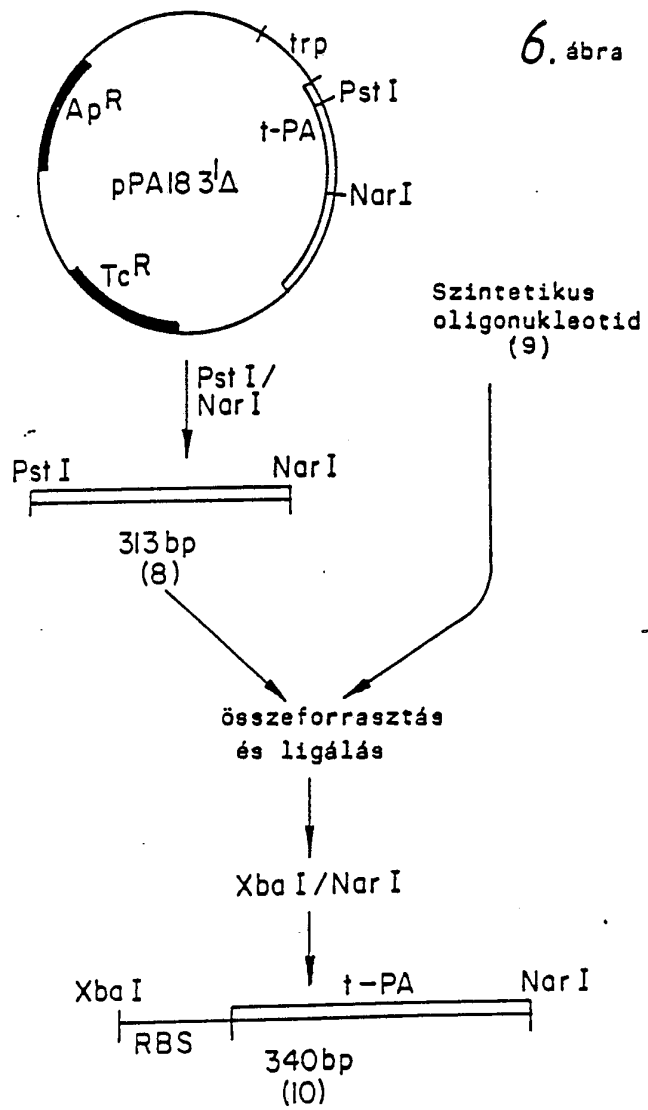
4. ábra

5A. ábra

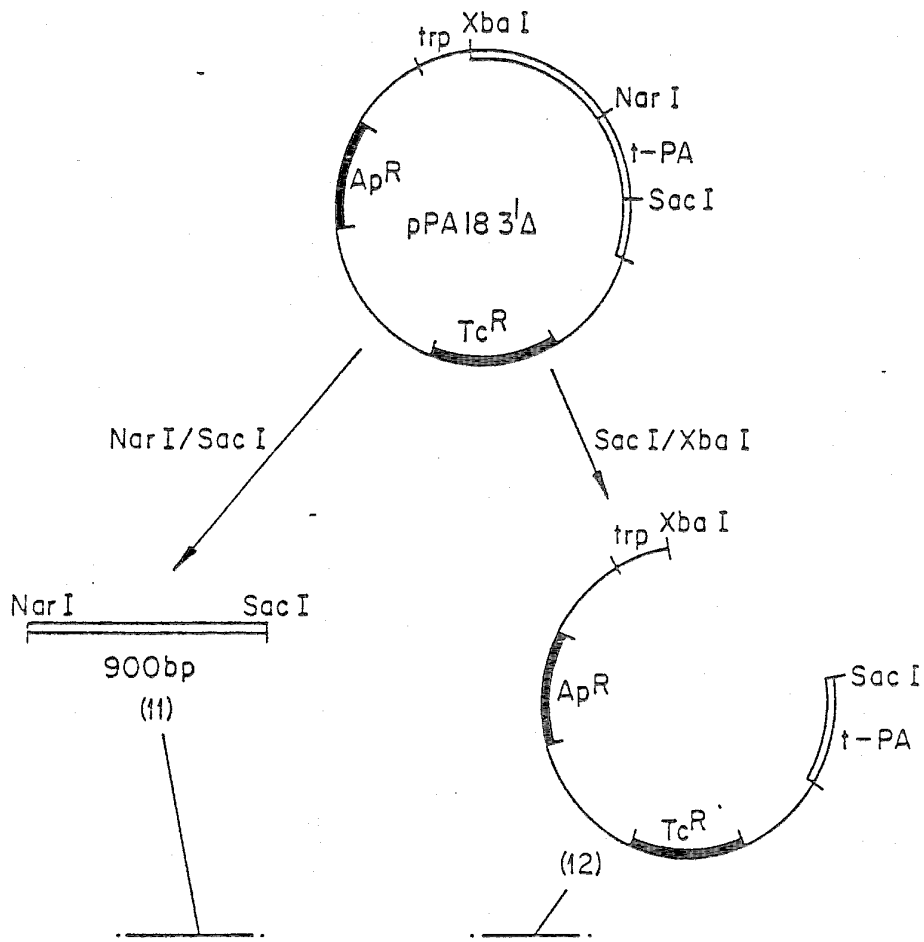


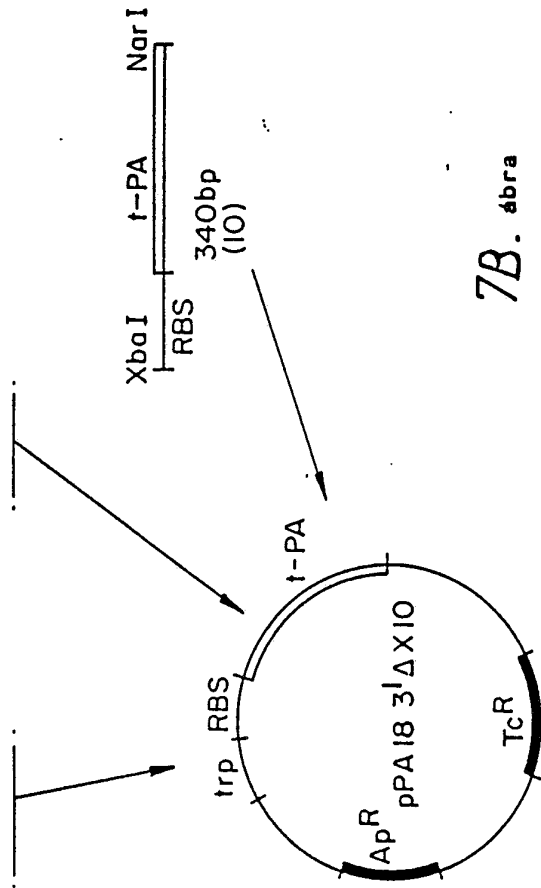


5B. ábra



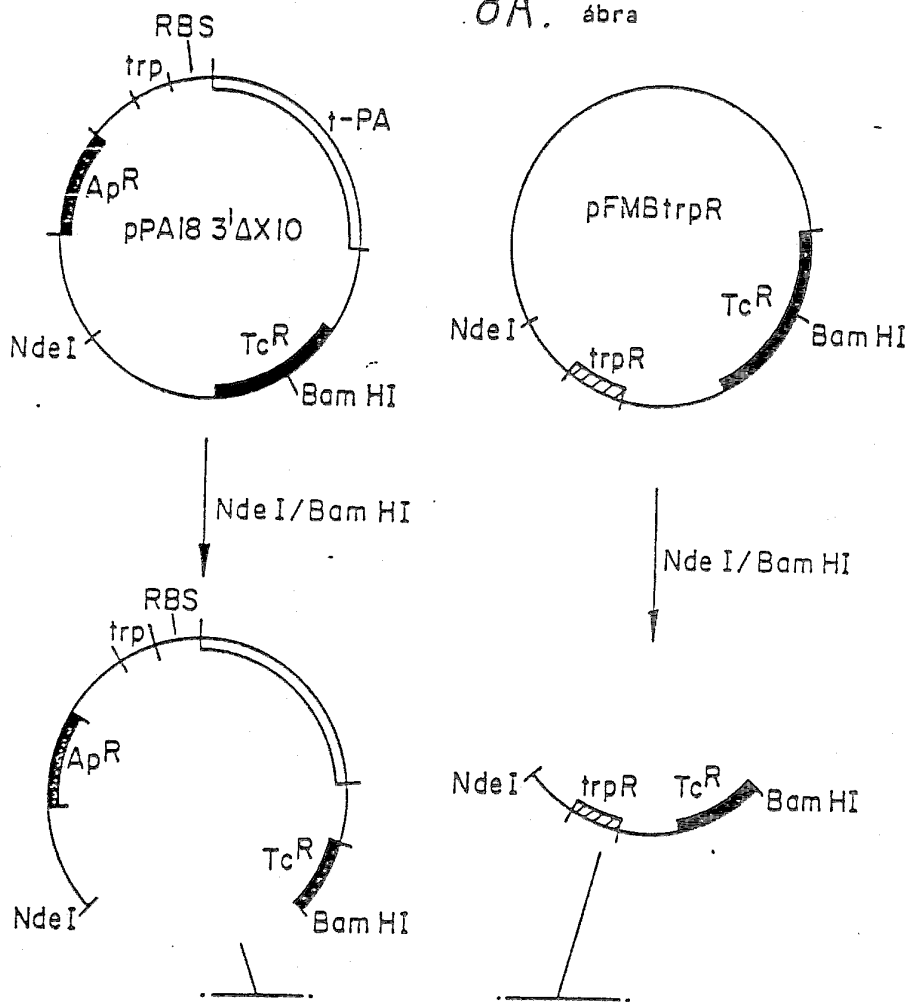
7A. abra

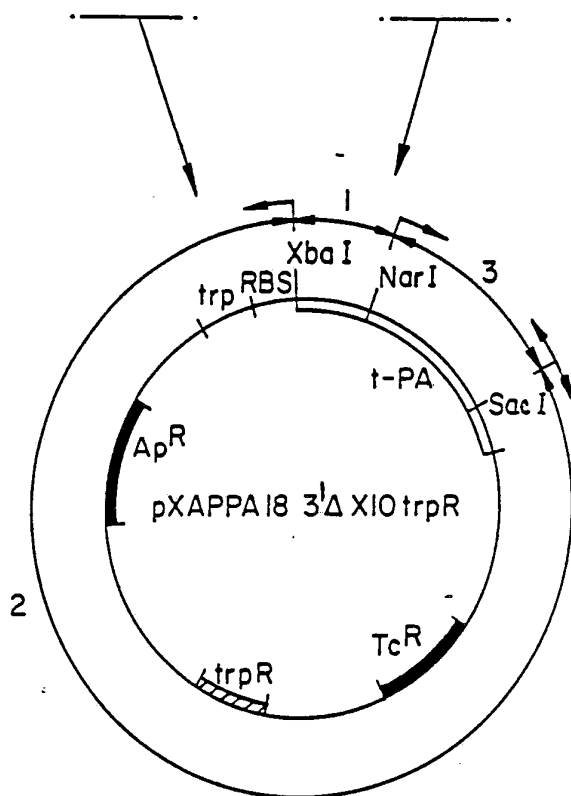




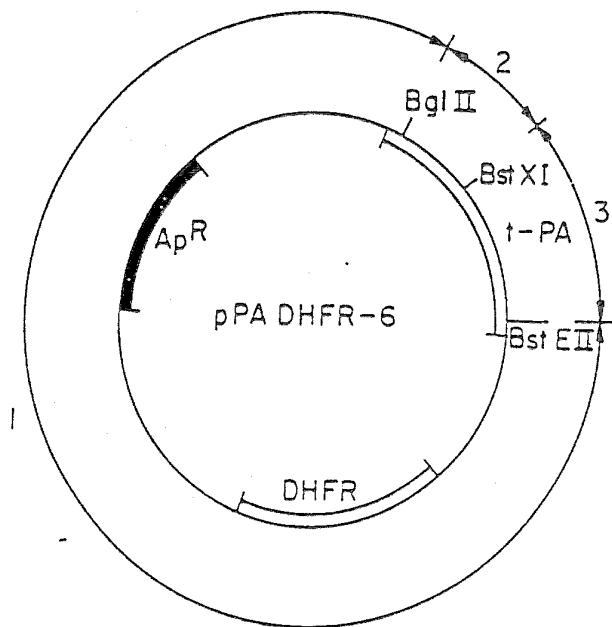
7B. ábra

8A. ábra



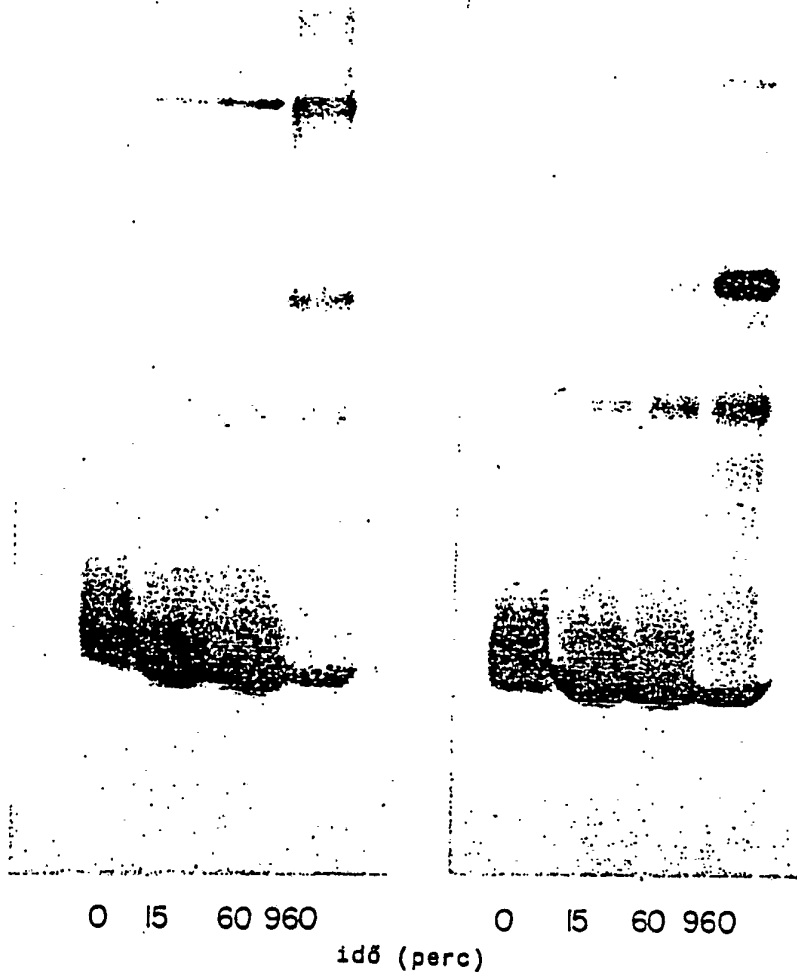


8B. ábra

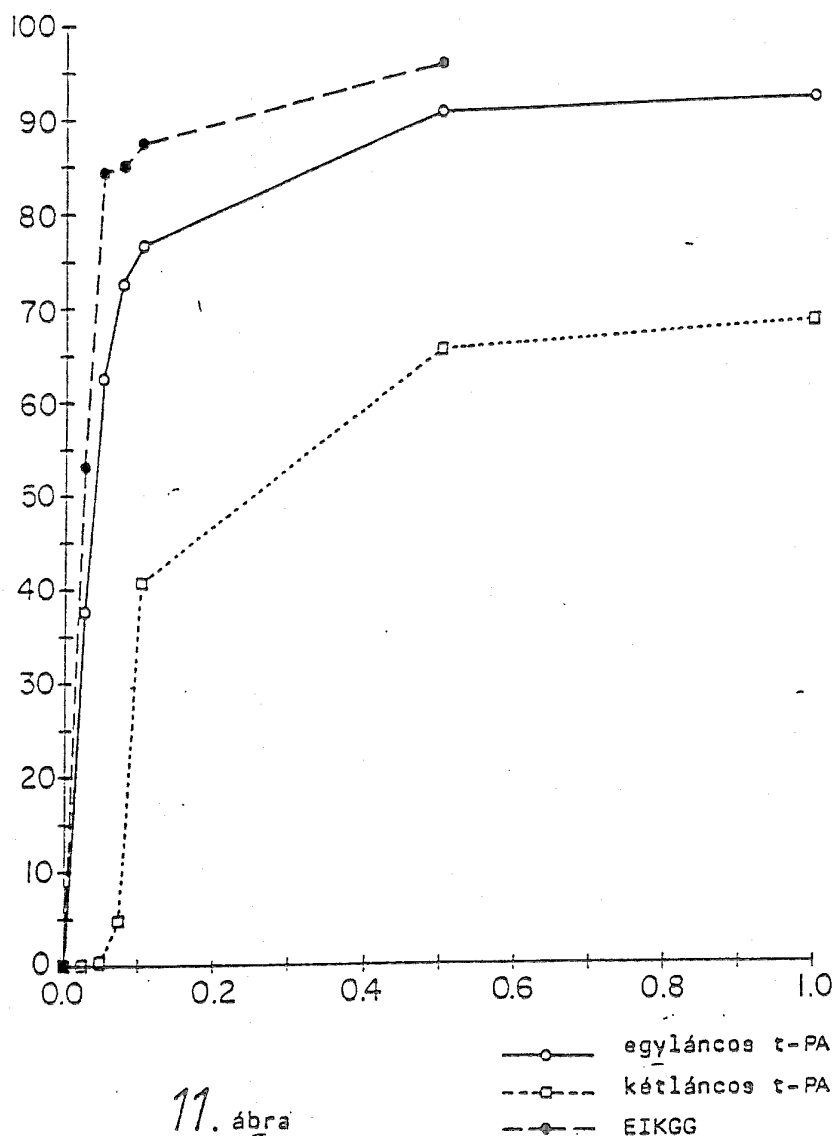


9. ábra

10. ábra



Egy- és kétláncos t-PA fibrinkötése aktivitás  
alapján



11. ábra

EIK / TPA : in vivo rög-lizálás

