

**KÖZZÉTÉTEL
PÉLDÁNY**

h33/90



5. j. á. r. e. i.

pneumolizin-mutánsok és ezekkel előállított pneumococcus
vakcinák előállítására

DE STAAT DER NEDERLANDEN VERTEGENWOORDIGD DOOR DE MINISTER VAN
WELZIJN, VOLKSGEZONDHEID EN CULTUUR, RIJSWIJK, Hollandia

A bejelentés napja: 1989. 12. 15.

Elsőbbsége: 1988. 12. 16. (PJ 1989) Ausztrália

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/AU 89/00539

A nemzeti közzététel száma: Wo 90/06257

K I V O N A T

A találmány tárgya aminosav-helyettesítésekkel létrehozott
nem-toxikus mutáns pneumolizin. Ezek a mutánsok vad-típusú
pneumolizinre reagáló állatokban immunválaszt váltanak ki. A
találmány tárgyát képezik az ezeken a mutánsokon alapuló, emberek
számára alkalmas vakcinák, köztük olyan vakcinák, amelyek
pneumococcus kapszuláris poliszacharid-konjugátumokat
tartalmaznak.

Földvár

433/90

0407

58804

KÉPVISELŐ:

DANUBIA SZABADALMI ÉS
VÉDJEGY IRODA KFT
BUDAPEST

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

A

W02 C12N15/31
C12P21/00
A61K39/09

Egyedül

Pneumolizin mutánsok és ezekkel előállított pneumococcus
vakcinák előállítására

DE STAAT DER NEDERLANDEN VERTEGENWOORDIGD DOOR DE MINISTER VAN
WELZIJN, VOLKSGEZONDHEID EN CULTUUR, RIJSWIJK, Hollandia

Feltalálók:

PATON, James Cleland, Parkside, S.A., Ausztrália

HANSMAN, David John, Rose Park, S.A., Ausztrália

BOULNOIS, Graham John, Leicestershire, Nagy-Britannia

ANDREW, Peter William, Leicestershire, Nagy-Britannia

MITCHELL, Timothy John, Staffordshire, Nagy-Britannia

WALKER, John Arthur, Memphis, TN, Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1989. 12. 15.

Elsőbbsége: 1988. 12. 16. (PJ 1989) Ausztrália

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/AU 89/00539

Nemzetközi közzététel dátuma: W090106951

72622-1140-GÁ/KmO

A találmány tárgya pneumolizin mutánsok és ezekkel előállított pneumococcus vakcinák.

A *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) fontos patogén, amely elterjedt körben okoz olyan megbetegedéseket, mint például a tüdőgyulladás, a meningitis és a bacteraemia. A pneumococcus okozta tüdőgyulladás még olyan területeken is 19 %-os mortalitással jár kórházban lévő betegeknél, ahol az antibiotikus terápia szabadon hozzáférhető, és ez az érték a bacteraemiában szenvedő betegeknél 30 - 40 %-ra nő. Ezt a magas mortalitási arányt az Amerikai Egyesült Államokból közölték, ahol a tüdőgyulladás, amelynek megszokásosabb okozója a *S. pneumoniae*, a halált okozó megbetegedések rangsorában az ötödik. Valójában, ebben az országban a halált okozó betegségek rangsorának első 10 képviselője között a tüdőgyulladás az egyetlen fertőző betegség. Az Amerikai Egyesült Államokban a pneumococcus okozta meningitis mortalitási aránya 13 - 45 %. A fejlődő országokban évente 3 milliónál több gyermek hal meg 5 éves kora előtt tüdőgyulladásban, amelynek ismét a *S. pneumoniae* a leggyakoribb előidézője. A *S. pneumoniae* okozója továbbá kevésbé súlyos, de nagy számban előforduló fertőzéseknek is, például a középfülgyulladásnak és a melléküreggyulladásnak, amelyek jelentős kihatással vannak a fejlett országok egészségügyi ellátásának költségeire. A középfülgyulladás különösen fontos megbetegedés fiatal gyermekeknél, a melléküreggyulladás mind gyermekeket, mind felnőtteket érint.

Az 1970-es évek végén egy vakcinát engedélyeztek súlyos fertőzések, különösen bakteriális tüdőgyulladás megelőzésére és

bizonyos csoportoknak, például a lép eltávolításon átesetteknek és fiatal gyermekeknek a védelmére, akik különösen fogékonyak heveny pneumococcus-os megbetegedésekre. A vakcina tisztított kapszuláris poliszacharidokból áll, amelyek a pneumococcusok felületi antigénjei közül a legfontosabbak. Azonban, a *S. pneumoniae* szerotípusainak (amelyekből 83 létezik) mindegyike szerkezetileg különböző kapszuláris poliszachariddal bír, így az egy szerotípussal szemben végzett immunizálás nem hoz létre semmiféle védelmet a többi szerotípus többsége ellen. A jelenleg Ausztráliában engedélyezett vakcina a 23 leggyakoribb szerotípusból tisztított poliszacharidokat tartalmazza, ez az Ausztráliában előforduló pneumococcus fertőzések mintegy 90 %-a ellen véd.

Nem mondható tökéletesnek a védelem azon szerotípusok ellen sem, amelyeket a vakcina tartalmaz, és megjelent néhány közlemény arra vonatkozóan, hogy súlyos, esetenként végzetes fertőzések fordultak elő vakcinált nagy rizikójú egyéneknél. A vakcina hatékonysága gyengébb fiatal gyermekeknél, néhány vizsgálat, köztük egy Adelaide-ben lefolytatott is, azt mutatja, hogy a létező készítmények ebben a körben klinikailag kevésbé hatásosak, vagy hatásuk ki sem mutatható. A vakcinának ez a nyilvánvaló hatástalansága azzal kapcsolatos, hogy az 5 év alatti korú gyermekeknél bizonyos *Pneumococcus* poliszacharidok immunogenitása gyenge. Kimutattuk, hogy az antitest válasz különösen gyenge az iránt az öt szerotípus iránt, amelyek a gyermekek körében szokásosan megbetegedést okoznak (6, 14, 18, 19 és 23 típus). Az ezekre a

pneumococcus poliszacharidokra adott antitest válasz valójában a 8 év fölötti gyermekek esetén is csak megközelíti a vakcinálás idején a felnőtteknél jelentkező szintet.

A fentieket figyelembe véve a fiatal gyermekek pneumococcus fertőzésektől való védelmére olyan vakcina látszik szükségesnek, amely a kapszuláris poliszacharidoktól eltérő más antigéneket tartalmaz. Egy ilyen antigén lehet a pneumolizin, amely egy olyan protein toxin, amelyet minden virulens *S. pneumoniae* izolátum termel. Egereknek ezzel a fehérjével történt immunizálása esetén a pneumococcus fertőzésekkel szemben bizonyos mértékű védettség észlelhető.

Nehézséget jelent azonban az, hogy a pneumolizin emberre toxikus. A pneumolizint tartalmazó vakcinának lényegében nem-toxikusnak kell lennie. Azonban, ha a pneumolizint a jelenleg alkalmazott módszerekkel nem-toxikussá tennénk, az valószínűleg úgy változtatná meg a fehérje alapkonfigurációját, hogy immunogén szempontból eltérővé válna a natív vagy vad-típusú pneumolizintól. A natív pneumolizintól immunogén szempontból különböző megváltoztatott protein által kiváltott immunválasz csökkent védőkapacitást jelenthetne, vagy egyáltalán nem nyújtana védelmet. A feladat nehézsége tehát abban áll, hogy olyan megváltoztatott pneumolizint állítsunk elő, amely nem toxikus, és amely egyidejűleg immunogén szempontból eléggé hasonló a toxikus formához ahhoz, hogy a védő immunválaszt kiváltsa.

A fenti jellemzőkkel bíró megváltoztatott pneumolizin azután számos módon alkalmazható vakcinában. Így a megváltoztatott pneumolizin alkalmazható önmagában immunizálásra, vagy más



megoldás szerint a megváltoztatott pneumolizin pneumococcus poliszacharidhoz köthető, vagy ismét más megoldás szerint olyan vakcinába vihető be, amelyben a pneumococcus poliszacharid egy másik fehérjéhez van kötve, és a megváltoztatott pneumolizin csak nem-kötött formában van jelen. Más megoldás szerint a pneumococcus poliszacharid és a pneumolizin mindegyike nem-kötött formában használható.

Tárgan meghatározva a találmány tárgya egy megváltoztatott pneumolizin, amely lényegében nem-toxikus, és amely képes arra, hogy immunválaszt váltson ki olyan állatban, amely a vad-típusú pneumolizinre reakciót ad.

Előnyösen a megváltoztatott pneumolizin a vad-típusú pneumolizinhez képest csökkent komplement-kötő aktivitással bír. A komplement-kötő aktivitás csökkenése azt eredményezi, hogy a vakcina beadásának helyén kisebb mértékű gyulladás jön létre.

Előnyösen a megváltoztatott pneumolizin csökkent Fc-kötő aktivitással bíró a vad-típusú pneumolizinhez képest. Az Fc-kötő aktivitás csökkenése azzal jár, hogy a vakcina beadásának helyén kisebb mértékű gyulladás jön létre.

Előnyösen a megváltoztatott pneumolizin a vad-típusú pneumolizintől abban különbözik, hogy egy vagy több aminosavját helyettesítjük.

A pneumolizin a vad-típusú pneumolizinhez képest eltérhet abban, hogy a vad-típusú pneumolizin 367, 384, 385, 428, 433 vagy 435 helyén vagy ezen helyek közül több helyen előforduló aminosavat helyettesítünk, eltávolítunk vagy blokkolunk.

A találmány tárgya továbbá egy vakcina, amely egy megvál-

toztatott pneumolizint tartalmaz, amely megváltoztatott pneumolizin nem-toxikus és képes arra, hogy immunválaszt váltson ki olyan állatból, amely a vad-típusú pneumolizinre reagál.

Előnyösen a vakcina a megváltoztatott pneumolizinnel kapcsolt kapszuláris poliszacharid anyagot tartalmaz.

A kapszuláris anyag származhat a 6A, 6B, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 2, 3, 4, 5, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20, 22F és 33F Streptococcus pneumoniae szerotípusok közül egyből vagy többől.

Ebben a megvalósítási formában azok a szerotípusok, amelyek szokásosan a gyermekek megbetegedésével kapcsolatosak, és amelyek iránt a gyermekek immunválasza gyenge, specifikusan megcélozhatók (azaz a 6A, 6B, 14, 18C, 19A, 19F és 23F dán szerotípusok). Használhatók azonban a konjugátok szintetizálására más, a 23 értékű Merck Sharp és Dohme vakcinában (Pneumovax 23) jelenlévő más szokásos szerotípusok is (azaz az 1, 2, 3, 4, 5, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20, 22F és 33F) vagy valójában bármely más szerotípus. Bármely pneumococcus poliszacharidnak a fehérje hordozóhoz való kötése jó T-sejt függő immunogenitást biztosít gyermekeknél, így védő szintű anti-poliszacharid antitest termelődik.

A megváltoztatott pneumolizin kapszuláris anyaggal való kombinálása különleges mértékű védelmet biztosít, különösen a S. pneumoniae olya szerotípusai ellen, amelyek poliszacharidjai a létező vakcina készítményekben nincsenek benne.

A vakcinát előnyösen szubkután injekció formájában adjuk be segédanyag nélkül ^{vagy} megengedett segédanyaggal, például alumínium-

oxid-géllal.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy rekombináns klón, amely egy replikont és egy olyan DNS-szekvenciát tartalmaz, amely egy megváltoztatott pneumolizint kódol, amely megváltoztatott pneumolizin nem toxikus és képes arra, hogy a vad-típusú pneumolizinre reagáló állatban immunválaszt váltson ki.

A találmány tárgyát képezi továbbá a megváltoztatott pneumolizin előállításának eljárása, amely magában foglalja a megváltoztatott pneumolizin tisztítását egy olyan expressziós rendszerből, amely egy a megváltoztatott pneumolizint kódoló DNS-t tartalmazó rekombináns klónt tartalmaz, ahol a megváltoztatott pneumolizin lényegében nem toxikus és képes arra, hogy a vad-típusú pneumolizinre reagáló állatban immunválaszt váltson ki.

Előnyösen az expressziós rendszer egy olyan gazdasejt tenyészet, amely a megváltoztatott pneumolizint kódoló DNS-t tartalmazó rekombináns klónt magában foglalja.

A találmány tárgyát képezi továbbá a vakcina termelésére szolgáló eljárás, amely a következő lépéseket foglalja magában: a megváltoztatott pneumolizint kódoló rekombináns klón megsokszorozása, a klónozott anyag transzkripciójának és translációjának kiváltása, a megváltoztatott pneumolizin tisztítása, és a kapszuláris poliszacharidnak a megváltoztatott pneumolizinnel való kapcsolása, ahol a megváltoztatott pneumolizin toxikus hatása lényegében csökkent a vad-típusú pneumolizinéhez képest.

A találmány egyes megvalósítási módjait a következőkben a jobb érthetőség kedvéért az ábrákra való hivatkozással írjuk le.

Az 1. ábrán a vad-típusú pneumolizint kódoló gén DNS

szekvenciáját mutatjuk be. Az ábrán az Atg start kodont aláhúzás jelöli.

A 2. ábrán a pneumolizin génnek expressziós vektorba való klónozására alkalmazott, vad típusú pneumolizint kódoló megváltoztatott gén DNS szekvenciáját mutatjuk be. Aláhúzással jelöljük a start kodonnál bevezetett Ncol restriktációs helyet.

A 3. ábrán a vad-típusú pneumolizint kódoló gén DNS szekvenciájából leszarmaztatott aminosav szekvenciát mutatjuk be.

A 4. ábrán olyan pneumolizin aminosav-szekvenciáját mutatjuk be, amelyen hely-specifikus mutáció révén bevitt aminosav helyettesítés látható.

Az embernek való beadásra alkalmas nem-toxikus pneumolizinszármazékok létrehozására rekombináns DNS eljárást alkalmazunk. Ennek elérésére a pneumolizint kódoló *S. pneumoniae* gént

Escherichia coli-ba klónozzuk, és teljes DNS szekvenciáját meghatározzuk. A DNS szekvenciát az 1. ábrán, az ebből leszarmaztatott aminosav szekvenciát a 3. ábrán mutatjuk be.

A pneumolizin gén három tartományát tettük ki oligonukleotiddal irányított mutációnak. Az első tartomány a protein szekvencia 427-437-es aminosavjait kódolja, a 3. ábrán ezt a tartományt aláhúzással jelöljük. Ez a 11 aminosavból álló szekvencia teljes homológiát mutat más rokon tiol-aktivált toxinok hasonló tartományaival, így feltehető, hogy ez a tartomány felelős a hemolitikus hatásért, és ennek folytán a toxin toxikus hatásáért. A másik két tartomány a 257 - 297 és a 368 - 397 számú aminosavakat kódoló tartományok, ezeket a 3. ábrán ugyancsak aláhúzással jelöljük. A toxinnak ez a két

tartománya aminosav-szekvenciáját tekintve lényegében homológ a humán C-reaktív proteinnel (CRP), ebből következően feltehetően a pneumolizinnel azért a képességéért felelős, hogy az immunoglobulinok Fc tartományához kötődik, és hogy komplementet aktivál. A pneumolizin génben 15 különböző mutációt hoztunk létre, amely egyetlen aminosav helyettesítést eredményez, amint az a 4. ábrán látható. Annak érdekében, hogy a megváltoztatott pneumolizin szerkezetét megőrizzük, konzervatív helyettesítéseket végeztünk úgy, hogy az aminosavakat hasonló természetű aminosavakkal helyettesítettük.

A hemolitikus aktivitásban érintett tartományok, a Cys₄₂₈->Gly, Cys₄₂₈->Ser, Trp₄₃₃->Phe, Glu₄₃₄->Asp és Trp₄₃₅->Phe, mindegyike csökkenti a hemolitikus aktivitást rendre 97, 90, 99, 75 illetve 90 % értékkel. Az ebben a tartományban végrehajtott egyéb mutációk (Cys₄₂₈->Ala, Glu₄₃₄->Gln és Trp₄₃₆->Phe) nem érintik a hemolitikus aktivitást. A toxinnak egy olyan másik tartományán mutációt kiváltva, amelyről feltételezhető, hogy a cél sejt membránokhoz való kötődésért felelős, ugyan csak befolyásolja a protein hemolitikus aktivitását. Ez a helyettesítés, a His₃₆₇->Arg, teljesen meggátolja a hemolitikus aktivitást. Az, hogy a His₃₆₇->Arg helyettesítés nagyobb gátlást hoz létre a hemolitikus aktivitásban, mint a hemolitikus aktivitásért felelősnek tartott 11 aminosavból álló tartományban megvalósított helyettesítés, nem várt eredmény.

A CRP-szerű tartományokban létrejövő mutációkat vizsgáltuk a komplement aktiválásra való képesség szempontjából. A Trp₃₇₉->Phe, Tyr₃₈₄->Phe, Asp₃₈₅->Asn és Trp₃₉₇->Phe mutációk

esetén a komplement aktiválás rendre 20, 70, 100, illetve 15 %-kal csökkent. A CRP-szerű tartományban bekövetkezett, a 4. ábrán bemutatott egyéb mutációk nem csökkentik a komplement aktiválást.

Fontos, hogy a fenti mutációk akár a hemolitikus aktivitást, akár a komplement aktiválást érintik, nem rontják a protein immunogén tulajdonságát a natív vagy vad-típusú pneumolysinhez viszonyítva.

Így, bár a His₃₆₇->Arg mutáció előnyös a hemolitikus aktivitás csökkentése szempontjából, két vagy több, a hemolitikus aktivitást érintő mutáció révén is igen nagy mértékű hemolitikus aktivitás csökkenés érhető el. Hasonló módon, a komplement aktiválás szempontjából előnyös mutáció az Asp₃₈₅->Asn, azonban két vagy több más mutáns, amely kisebb mértékben csökkenti az aktivitást, ugyancsak alkalmas.

A vakcina készítésre alkalmazott pneumolysin származék egy előnyös megvalósítási mód szerint a fenti mutációk közül bizonyosakat tartalmaz, amelyek eredményeként a protein nem képes a komplement aktiválására, és emellett zéro hemolitikus aktivitással bír. Ilyen kombinációk az alábbiak:

- 1) His₃₆₇->Arg + Asp₃₈₅->Asn,
- 2) His₃₆₇->Arg + Asp₃₈₅->Asn + vagy Cys₄₂₈->Gly vagy Trp₄₃₃->Phe
- 3) Asp₃₈₅->Asn + Cys₄₂₈->Gly + Trp₄₃₃->Phe

A fentiek előnyös kombinációk, azonban meg kell jegyeznünk, hogy más mutáció kombinációk is alkalmazhatók vakcina készítésre alkalmas megváltoztatott pneumolysin előállítására. Továbbá, a

megváltoztatott pneumolizin tartalmazhatja az egyedi mutációk bármelyikét, amely kellően csökkenti az aktivitást.

A megváltoztatott pneumolizint kódoló DNS-ből a megváltoztatott pneumolizin magas szintű kifejezése a szokásosan alkalmazott eljárások bármelyikével megvalósítható, köztük prokariota gazdaszervezetben való kifejezéssel, amely esetben a DNS-t a számos, jelenleg hozzáférhető expressziós vektor valamelyikébe klónozzuk, vagy a gazdaszervezet kromoszómájába megfelelően klónozzuk; eukariota gazdaszervezetben való kifejezéssel, amely esetben a DNS-t megfelelően klónozzuk egy expressziós vektorba vagy a gazdaszervezet kromoszómájába; vagy alkalmazhatunk egy in vitro expressziós rendszert, például olyat, amely a megváltoztatott pneumolizin expressziójához szükséges tisztított komponenseket tartalmazza.

A mutációval létrehozott pneumolizin gén magas szintű expressziója érdekében azt a PKK233-2 vektorba klónoztuk *Escherichia coli*-ban vagy más hasonló prokariotában való expresszió céljára. Ez a vektor ampicillin és tetraciklin rezisztens géneket tartalmaz, a *trc* promoter (amely IPTG-dal - izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid - szabályozható) és a *lac Z* riboszóma-kötő hely szomszédos egy *NcoI* restrikciós helyet tartalmazó ATG iniciátor kodonnal. Az iniciátor kodontól közvetlenül 3' irányban vannak a *PstI* és *HindIII* restrikciós helyek, ezt követi egy erős T_1T_2 transzkripció terminátor. A pneumolizint kódoló szekvencia 5' végén oligonukleotiddal irányított mutagenezissel *NcoI* restrikciós helyet hoztunk létre a PKK233-2 vektorba való beépítést megelőzően, amint az a 2.

ábrán látható. Ez képessé tette a megváltoztatott pneumolizin gén közelebbi végét arra, hogy a pKK233-2 vektor Ncol helyébe klónozzható legyen; a megváltoztatott gén távolabbi végének a pKK233-2 vektor kompatibilis helyébe való beillesztésére a pneumolizin terminátor kodontól 3' irányban mintegy 80 bázisnyira lévő HindIII helyet használtuk. A mutáns pneumolizin-származék azonban számos nagy expresszióval bíró vektorrendszer bármelyikébe klónozzható.

A pneumolizin mutánst a következő módon készítjük: a fenti rekombináns plazmidot befogadó E. coli sejteket először 9 literes, a megfelelő antibiotikummal kiegészített Luria Bertan (vagy bármely más megfelelő) tápközegben tenyésztünk 37 °C hőmérsékleten levegőztetéssel. Amikor a tenyészet a szaporodás logaritmikus fázisának késői szakaszát eléri, IPTG-t adunk hozzá 20 $\mu\text{mol/l}$ végkoncentrációnak megfelelő mennyiségben (hogy a megváltoztatott pneumolizin gén expresszióját indukáljuk), és az inkubálást további 2 - 3 órán át folytatjuk.

A sejteket ezután centrifugálással vagy ultraszűréssel összegyűjtjük, EDTA-val és lizozimmal való kezeléssel lizáljuk, majd ultrahanggal kezeljük vagy egy francia nyomáskamrában roncsoljuk. A sejttörmeléseket centrifugálással eltávolítjuk, az extraktumot 10 mmol/l -es pH = 7,0-as nátrium-foszfáttal szemben kimerítően dializáljuk. Az anyagot ezután DEAE-cellulóz-oszlopra visszük, eluensként pH = 7,0-as nátrium-foszfátot alkalmazunk 10 - 250 mmol/l közötti gradiensben. A pneumolizin származék legmagasabb szintjét tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, ultraszűréssel töményítjük, majd Sephacryl S-200 oszlopra

visszük. Kifejlesztőszerként pH = 7,0-as, 50 mmól/l-es nátrium-foszfátot alkalmazunk, és ismét azokat a frakciókat gyűjtjük össze, amelyekben legmagasabb a pneumolizin mennyisége, az összegyűjtött frakciókat ultraszűrőssel besűrítjük, és -15 °C hőmérsékleten 50 %-os glicerinenben tároljuk. A végtermék tisztasága SDS-poliakrilamid-gél elektroforézis bizonyosága alapján 95 % feletti. Egy másik, ugyancsak használható tisztítási mód a hidrofób interakciós kromatográfia fenil-Sepharose tölteten. Megjegyezzük azonban, hogy ez a megváltoztatott pneumolizin tisztítására csak egy eljárás, más alternatív eljárások (köztük nagynyomású folyadékkromatográfia) ugyancsak alkalmazható.

Ezt a tisztított megváltoztatott pneumolizint vakcinaként megfelelő szintben adagolhatjuk önmagában vagy más antigénekkal kombinálva. A megoldások egyike szerint a pneumolizin az előzőekben leírt pneumococcus törzsek közül egyből vagy többől származó poliszachariddal kapcsolható.

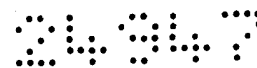
A mutáns pneumolizin különböző szerotípusú poliszacharidokhoz kapcsolható számos eljárással. Ezek egyike aktivált poliszacharid előállítására tiszta poliszacharidnak (kereskedelmi forgalomban beszerzett) cianogén-bromiddal és adipinsav-dihidraziddal (ADH) való kezelése. Ezt követően az ADH-poliszacharidot a mutáns pneumolizinnel 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-karbo-diimid-hidrogén-klorid jelenlétében egyesítjük. A konjugált anyagot a reagensektől Sepharose CL-4B kromatográfiás eljárással választjuk el.

Más megoldás szerint a poliszacharid - mutáns pneumolizin konjugát előállítható bifunkciós reagensek, például N-szuk-

cinimidil-6-(4'-azido-2'-nitro-fenil-amino)-hexanoát (SANPAH) alkalmazásával. Foszfáttal pufferolt sóoldatban oldott tiszta poliszacharidot reagáltatunk erős fehér fényforrás jelenlétében SANPAH-tal. A reageálatlan SANPAH-ot ezután az aktivált poliszacharidtól Sephadex G-50 tölteten való kromatografálással választjuk el. Az aktivált poliszacharidot ezután 0,2 mól/l-es pH = 8,5-es borátpufferben kapcsoljuk össze a mutáns pneumolizinnel. Minden feleslegben lévő reakcióképes csoportot ezután lizinnel blokkolunk, és a poliszacharid-protein konjugátot a többi reagenstől Sepharose CL-4B tölteten való kromatografálással választjuk el. A konjugát előállítható ciano-bór-hidriddel végrehajtott redukív aminálással is.

Más megoldás szerint egy más protein, például inaktivált tetanusz toxin kapcsolható a kívánt poliszachariddal, és a megváltoztatott pneumolizin a vakcinához kötetlen formában adható hozzá.

A fentiekben a találmány legjobb megvalósítási módját írtuk le korlátozó szándék nélkül.



Szabadalmi igénypontok

1. Lényegében nem-toxikus megváltoztatott pneumolizin, amely képes arra, hogy vad-típusú pneumolizinre reagáló állatokban immunválaszt váltson ki.

2. Az 1. igénypont szerinti megváltoztatott pneumolizin, azzal jellemezve, hogy komplement kötő aktivitása a vad-típusú pneumolizinhez mérten csökkent.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti megváltoztatott pneumolizin, azzal jellemezve, hogy Fc kötő aktivitása a vad-típusú pneumolizinhez képest csökkent.

4. Az 1.-3. igénypontok bármelyike szerinti megváltoztatott pneumolizin, azzal jellemezve, hogy a vad-típusú pneumolizintől egy vagy több aminosav helyettesítésében tér el.

5. Megváltoztatott pneumolizin, amely az alábbi aminosav szenvenciával bír:

Met Ala Asn Lys Ala Val Asn Asp Phe Ile Leu Ala Met
1 11
Asn Tyr Asp Lys Lys Lys Leu Leu Thr His Gln Gly Glu
21
Ser Ile Glu Asn Arg Phe Ile Lys Glu Gly Asn Gln Leu
31
Pro Asp Glu Phe Val Val Ile Glu Arg Lys Lys Arg Ser
41 51
Leu Ser Thr Asn Thr Ser Asp Ile Ser Val Thr Ala Thr
61
Asn Asp Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Ala Leu Leu Val Val
71
Asp Glu Thr Leu Leu Glu Asn Asn Pro Thr Leu Leu Ala
81 91
Val Asp Arg Ala Pro Met Thr Tyr Ser Ile Asp Leu Pro
101
Gly Leu Ala Ser Ser Asp Ser Phe Leu Gln Val Glu Asp
111
Pro Ser Asn Ser Ser Val Arg Gly Ala Val Asn Asp Leu
121
Leu Ala Lys Trp His Gln Asp Tyr Gly Gln Val Asn Asn
131 141



Val Pro Ala Arg Met Gln Tyr Glu Lys Ile Thr Ala His
151
Ser Met Glu Gln Leu Lys Val Lys Phe Gly Ser Asp Phe
161
Glu Lys Thr Gly Asn Ser Leu Asp Ile Asp Phe Asn Ser
171 181
Val His Ser Gly Glu Lys Gln Ile Gln Ile Val Asn Phe
191
Lys Gln Ile Tyr Tyr Thr Val Ser Val Asp Ala Val Lys
201
Asn Pro Gly Asp Val Phe Gln Asp Thr Val Thr Val Glu
211 221
Asp Leu Lys Gln Arg Gly Ile Ser Ala Glu Arg Pro Leu
231
Val Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr
241
Leu Lys Leu Glu Thr Thr Ser Lys Ser Asp Glu Val Glu
251
Ala Ala Phe Glu Ala Leu Ile Lys Gly Val Lys Val Ala
261 271
Pro Gln Thr Glu Trp Lys Gln Ile Leu Asp Asn Thr Glu
281
Val Lys Ala Val Ile Leu Gly Gly Asp Pro Ser Ser Gly
291
Ala Arg Val Val Thr Gly Lys Val Asp Met Val Glu Asp
301 311
Leu Ile Gln Glu Gly Ser Arg Phe Thr Ala Asp His Pro
321
Gly Leu Pro Ile Ser Tyr Thr Thr Ser Phe Leu Arg Asp
331
Asn Val Val Ala Thr Phe Gln Asn Ser Thr Asp Tyr Val
341 351
Glu Thr Lys Val Thr Ala Tyr Arg Asn Gly Asp Leu Leu
361
Leu Asp R₁ Ser Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Tyr Ile
371
Thr R₂ Asp Glu Leu Ser R₃ R₄ His Gln Gly Lys Glu
381
Val Leu Thr Pro Lys Ala R₅ Asp Arg Asn Gly Gln Asp
391 401
Leu Thr Ala His Phe Thr Thr Ser Ile Pro Leu Lys Gly
411
Asn Val Arg Asn Leu Ser Val Lys Ile Arg Glu R₆ Thr
421
Gly Leu Ala R₇ R₈ R₉ Trp Arg Thr Val Tyr Gly Lys
431 441
Thr Asp Leu Pro Leu Val Arg Lys Arg Thr Ile Ser Ile
451
Trp Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Gln Val Glu Asp Lys Val
461
Glu Asn Asp
471

ahol R_1 jelentése His vagy Arg, R_2 jelentése Trp vagy Phe, R_3 jelentése Tyr vagy Phe, R_4 jelentése Asp vagy Asn, R_5 jelentése Trp vagy Phe, R_6 jelentése Cys, Gly vagy Ser, R_7 jelentése Trp vagy Phe, R_8 jelentése Glu vagy Asp, R_9 jelentése Trp vagy Phe, és ahol az R_1 , R_6 , R_7 , R_8 és R_9 csoportok közül legalább egynek a jelentése a vad-típusú pneumolizinétől eltérő.

6. Az 5. igénypont szerinti megváltoztatott pneumolizin, azzal jellemezve, hogy képletében R_1 jelentése Arg, R_2 jelentése Trp, R_3 jelentése Tyr, R_4 jelentése Asn, R_5 jelentése Trp, R_6 jelentése Cys, R_7 jelentése Trp, R_8 jelentése Glu és R_9 jelentése Trp.

7. Megváltoztatott pneumolizint tartalmazó vakcina, azzal jellemezve, hogy a pneumolizin nem-toxikus, és képes arra, hogy vad-típusú pneumolizinre reagáló állatokban immunválaszt váltson ki.

8. A 7. igénypont szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy a 2-6. igénypontok bármelyike szerinti megváltoztatott pneumolizint tartalmazza.

9. Protein hordozóanyaggal kapcsolt kapszuláris poliszacharid anyagot és nem-kapcsolt protein anyagot tartalmazó vakcina, ahol a kapszuláris poliszacharid anyag egy vagy több *Streptococcus pneumoniae* szerotípusból származó, és a nem-kapcsolt protein anyag megváltoztatott pneumolizin, amely megváltoztatott pneumolizin nem-toxikus, és képes arra, hogy vad-típusú pneumolizinre reagáló állatokból immunválaszt váltson ki.

10. A 9. igénypont szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy kapszuláris anyaga a *Streptococcus pneumoniae* 6A, 6B, 14, 18C,

19A, 19F, 23F, 1, 2, 3, 4, 5, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20, 22F és 33F szerotípusok közül egyből vagy többől származik.

11. A 9. vagy 10. igénypont szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy a 2.-6. igénypontok bármelyike szerinti megváltoztatott pneumolizint tartalmazza.

12. Vakcina, azzal jellemezve, hogy protein hordozóanyaggal kapcsolt kapszuláris poliszacharid anyagot tartalmaz, amely kapszuláris poliszacharid anyag *Streptococcus pneumoniae* szerotípusok közül egyből vagy többől származik, és a protein hordozó egy megváltoztatott pneumolizin, amely megváltoztatott pneumolizin nem-toxikus, és képes arra, hogy vad-típusú pneumolizinre reagáló állatokból immunválaszt váltson ki.

13. A 12. igénypont szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy kapszuláris anyaga a *Streptococcus pneumoniae* 6A, 6B, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 1, 2, 3, 4, 5, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20, 22F és 33F szerotípusok közül egyből vagy többől származik.

14. A 12. vagy 13. igénypont szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy a 2-6. igénypontok bármelyike szerinti megváltoztatott pneumolizint tartalmazza.

15. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti megváltoztatott pneumolizint kódoló DNS szekvenciát tartalmazó rekombináns plazmid.

16. A 9. igénypont szerinti rekombináns plazmidot tartalmazó hibrid gazdasejt, ahol a rekombináns plazmid a megváltoztatott pneumolizint kódoló DNS-nak a gazdasejten belüli expressziójára

szolgáltató indukálható expressziós szabályozást tartalmaz.

17. Eljárás megváltoztatott pneumolizin előállítására, azzal jellemezve, hogy a megváltoztatott pneumolizint egy olyan expressziós rendszerből tisztítjuk, amely egy olyan megváltoztatott pneumolizint kódoló DNS-t tartalmazó rekombináns plazmidot tartalmaz, amely pneumolizin lényegében nem-toxikus és képes arra, hogy a vad-típusú pneumolizinre reagáló állatokban immunválaszt váltson ki.

18. Eljárás megváltoztatott pneumolizin előállítására, azzal jellemezve, hogy a megváltoztatott pneumolizint olyan gazdasejt tenyészetből tisztítjuk, amely egy olyan megváltoztatott pneumolizint kódoló DNS-t tartalmazó rekombináns klónt foglal magában, amely pneumolizin lényegében nem-toxikus és képes arra, hogy vad-típusú pneumolizinre reagáló állatokban immunválaszt váltson ki.

19. Eljárás vakcina előállítására, azzal jellemezve, hogy egy megváltoztatott pneumolizint kódoló rekombináns klónt sokszorozunk, a klónozott anyag transzkripcióját és translációját indukáljuk, a megváltoztatott pneumolizint tisztítjuk és a megváltoztatott pneumolizint kapszuláris poliszachariddal kapcsoljuk, ahol a megváltoztatott pneumolizin toxikus hatása a vad-típusú pneumolizinéhez képest lényegesen csökkent.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás vakcina előállítására, azzal jellemezve, hogy a 2-6. igénypontok bármelyike szerinti megváltoztatott pneumolizint alkalmazzuk.

A meghatalmazott:

Varga
 DANUBIA
 Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
 7.

19. oldal + 8. oldalal Földműv.

433/90.

8/150804

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

AGATGGCAAA TAAAGCAGTA AATGACTTTA TACTAGCTAT GAATTACGAT
 AAAAGAAAC TCTTGACCCA TCAGGGAGAA AGTATTGAAA ATCGTTTCAT
 CAAAGAGGGT AATCAGCTAC CCGATGAGTT TGTGTTTATC GAAAGAAAGA
 AGCGGAGCTT GTCGACAAAT ACAAGTGATA TTTCTGTAAC AGCTACCAAC
 GACAGTCGCC TCTATCCTGG AGCACTTCTC GTAGTGGATG AGACCTTGTT
 AGAGAATAAT CCCACTCTTC TTGCGGTTGA TCGTGCTCCG ATGACTTATA
 GTATTGATTT GCCTGGTTTG GCAAGTAGCG ATAGCTTTCT CCAAGTGGAA
 GACCCCAGCA ATTCAAGTGT TCGCGGAGCG GTAAACGATT TGTGGGCTAA
 GTGGCATCAA GATTATGGTC AGGTCAATAA TGTCCCAGCT AGAATGCAGT
 ATGAAAAAT AACGGCTCAC AGCATGGAAC AACTCAAGGT CAAGTTTGGT
 TCTGACTTTG AAAAGACAGG GAATTCTCTT GATATTGATT TTAACTCTGT
 CCATTCAGGT GAAAAGCAGA TTCAGATTGT TAATTTTAAG CAGATTTATT
 ATACAGTCAG CGTAGACGCT GTTAAAAATC CAGGAGATGT GTTTCAGAT
 ACTGTAACGG TAGAGGATTT AAAACAGAGA GGAATTTCTG CAGAGCGTCC
 TTTGGTCTAT ATTTGAGTG TTGCTTATGG GCGCCAAGTC TATCTCAAGT
 TGGAAACCAC GAGTAAGAGT GATGAAGTAG AGGCTGCTTT TGAAGCTTTG
 ATAAAAGGAG TCAAGGTAGC TCCTCAGACA GAGTGGRAGC AGATTTTGGG
 CAATACAGAA GTGAAGGCGG TTATTTTAGG GGGCGACCCA AGTTCGGGTG
 CCCGAGTTGT AACAGGCAAG GTGGATATGG TAGAGGACTT GATTCAAGAA
 GGCAGTCGCT TTACAGCAGA TCATCCAGGC TTGCCGATTT CCTATACAAC
 TTCTTTTTTA CGTGACAATG TAGTTGCGAC CTTTCAAAAC AGTACAGACT
 ATGTTGAGAC TAAGGTTACA GCTTACAGAA ACGGAGATTT ACTGCTGGAT
 CATAGTGGTG CCTATGTTGC CCAATATTAT ATTAATTGGG ATGAATTATC
 CTATGATCAT CAAGGTAAGG AAGTCTTGAC TCCTAAGGCT TGGGACAGAA
 ATGGGCAGGA TTTGACGGCT CACTTTACCA CTAGTATTCC TTTAAAAGGG
 AATGTTGTA ATCTCTCTGT CAAATTAGA GAGTGTACCG GGCTTGCCTG
 GGAATGGTGG CGTACGGTTT ATGAAAAAC CGATTTGCCA CTAGTGCCTA
 AGCGGACGAT TTCTATTTGG GGAACAATC TCTATCCTCA GGTAGAGGAT
 AAGGTAGAAA ATGAC


1. ábra

DANUBIA
szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
7.

John V. ...

CCATGGCAAA TAAAGCAGTA AATGACTTTA TACTAGCTAT GAATTACGAT
 AAAAAGAAAC TCTTGACCCA TCAGGGAGAA AGTATTGAAA ATCGTTTCAT
 CAAAGAGGGT AATCAGCTAC CCGATGAGTT TGTTGTTATC GAAAGAAAGA
 AGCGGAGCTT GTCGACAAAT ACAAGTGATA TTTCTGTAAC AGCTACCAAC
 GACAGTCGCC TCTATCCTGG AGCACTTCTC GTAGTGGATG AGACCTTGTT
 AGAGAATAAT CCCACTCTTC TTGCGGTTGA TCGTGCTCCG ATGACTTATA
 GTATTGATTT GCCTGGTTTG GCAAGTAGCG ATAGCTTTCT CCAAGTGGAA
 GACCCAGCA ATTCAAGTGT TCGCGGAGCG GTAAACGATT TGTTGGCTAA
 GTGGCATCAA GATTATGGTC AGGTCAATAA TGTCCCAGCT AGAATGCAGT
 ATGAAAAAAT AACGGCTCAC AGCATGGAAC AACTCAAGGT CAAGTTTGGT
 TCTGACTTTG AAAAGACAGG GAATTCTCTT GATATTGATT TTA ACTCTGT
 CCATTCAGGT GAAAAGCAGA TTCAGATTGT TAATTTTAAG CAGATTTATT
 ATACAGTCAG CGTAGACGCT GTTAAAAATC CAGGAGATGT GTTCAAGAT
 ACTGTAACGG TAGAGGATTT AAAACAGAGA GGAATTTCTG CAGAGCGTCC
 TTTGGTCTAT ATTTGAGTG TTGCTTATGG GCGCCAAGTC TATCTCAAGT
 TGGAAACCAC GAGTAAGAGT GATGAAGTAG AGGCTGCTTT TGAAGCTTTG
 ATAAAAGGAG TCAAGGTAGC TCCTCAGACA GAGTGGRAGC AGATTTTGGG
 CAATACAGAA GTGAAGGCGG TTATTTTAGG GGGCGACCCA AGTTCGGGTG
 CCCGAGTTGT AACAGGCAAG GTGGATATGG TAGAGGACTT GATTCAAGAA
 GGCAGTCGCT TTACAGCAGA TCATCCAGGC TTGCCGATTT CCTATACAAC
 TTCTTTTTTA CGTGACAATG TAGTTGCGAC CTTTCAAAC AGTACAGACT
 ATGTTGAGAC TAAGGTTACA GCTTACAGAA ACGGAGATTT ACTGCTGGAT
 CATAGTGGTG CCTATGTTGC CCAATATTAT ATTACTTGGG ATGAATTATC
 CTATGATCAT CAAGGTAAGG AAGTCTTGAC TCCTAAGGCT TGGGACAGAA
 ATGGGCAGGA TTTGACGGCT CACTTTACCA CTAGTATTCC TTTAAAAGGG
 AATGTTGTA ATCTCTCTGT CAAAATTAGA GAGTGTACCG GGCTTGCCTG
 GGAATGGTGG CGTACGGTTT ATGAAAAAC CGATTTGCCA CTAGTGCCTA
 AGCGGACGAT TTCTATTTGG GGAACAAC TCCTATCCTCA GGTAGAGGAT
 AAGGTAGAAA ATGAC

2. ábra


 DANUBIA
 Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



Met Ala Asn Lys Ala Val Asn Asp Phe Ile Leu Ala Met
1 11

Asn Tyr Asp Lys Lys Lys Leu Leu Thr His Gln Gly Glu
21

Ser Ile Glu Asn Arg Phe Ile Lys Glu Gly Asn Gln Leu
31

Pro Asp Glu Phe Val Val Ile Glu Arg Lys Lys Arg Ser
41 51

Leu Ser Thr Asn Thr Ser Asp Ile Ser Val Thr Ala Thr
61

Asn Asp Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Ala Leu Leu Val Val
71

Asp Glu Thr Leu Leu Glu Asn Asn Pro Thr Leu Leu Ala
81 91

Val Asp Arg Ala Pro Met Thr Tyr Ser Ile Asp Leu Pro
101

Gly Leu Ala Ser Ser Asp Ser Phe Leu Gln Val Glu Asp
111

Pro Ser Asn Ser Ser Val Arg Gly Ala Val Asn Asp Leu
121

Leu Ala Lys Trp His Gln Asp Tyr Gly Gln Val Asn Asn
131 141

Val Pro Ala Arg Met Gln Tyr Glu Lys Ile Thr Ala His
151

Ser Met Glu Gln Leu Lys Val Lys Phe Gly Ser Asp Phe
161

Glu Lys Thr Gly Asn Ser Leu Asp Ile Asp Phe Asn Ser
171 181

Val His Ser Gly Glu Lys Gln Ile Gln Ile Val Asn Phe
191

Lys Gln Ile Tyr Tyr Thr Val Ser Val Asp Ala Val Lys
201

Asn Pro Gly Asp Val Phe Gln Asp Thr Val Thr Val Glu
211 221

John Váha

Asp Leu Lys Gln Arg Gly Ile Ser Ala Glu Arg Pro Leu
231

Val Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr
241

Leu Lys Leu Glu Thr Thr Ser Lys Ser Asp Glu Val Glu
251

Ala Ala Phe Glu Ala Leu Ile Lys Gly Val Lys Val Ala
261 271

Pro Gln Thr Glu Trp Lys Gln Ile Leu Asp Asn Thr Glu
281

Val Lys Ala Val Ile Leu Gly Gly Asp Pro Ser Ser Gly
291

Ala Arg Val Val Thr Gly Lys Val Asp Met Val Glu Asp
301 311

Leu Ile Gln Glu Gly Ser Arg Phe Thr Ala Asp His Pro
321

Gly Leu Pro Ile Ser Tyr Thr Thr Ser Phe Leu Arg Asp
331

Asn Val Val Ala Thr Phe Gln Asn Ser Thr Asp Tyr Val
341 351

Glu Thr Lys Val Thr Ala Tyr Arg Asn Gly Asp Leu Leu
361

Leu Asp His Ser Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Tyr Ile
371

Thr Trp Asp Glu Leu Ser Tyr Asp His Gln Gly Lys Glu
381

Val Leu Thr Pro Lys Ala Trp Asp Arg Asn Gly Gln Asp
391 401

Leu Thr Ala His Phe Thr Thr Ser Ile Pro Leu Lys Gly
411

Asn Val Arg Asn Leu Ser Val Lys Ile Arg Glu Cys Thr
421

Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Tyr Glu Lys
431 441

Thr Asp Leu Pro Leu Val Arg Lys Arg Thr Ile Ser Ile
451

3. ábra folytatás
szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
7.

[Handwritten signatures]

433/90.

Trp Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Gln Val Glu Asp Lys Val^{8/5}
461

Glu Asn Asp
471

3. ábra folytatása

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
7.

[Handwritten signature]

Met Ala Asn Lys Ala Val Asn Asp Phe Ile Leu Ala Met
1 11

Asn Tyr Asp Lys Lys Lys Leu Leu Thr His Gln Gly Glu
21

Ser Ile Glu Asn Arg Phe Ile Lys Glu Gly Asn Gln Leu
31

Pro Asp Glu Phe Val Val Ile Glu Arg Lys Lys Arg Ser
41 51

Leu Ser Thr Asn Thr Ser Asp Ile Ser Val Thr Ala Thr
61

Asn Asp Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Ala Leu Leu Val Val
71

Asp Glu Thr Leu Leu Glu Asn Asn Pro Thr Leu Leu Ala
81 91

Val Asp Arg Ala Pro Met Thr Tyr Ser Ile Asp Leu Pro
101

Gly Leu Ala Ser Ser Asp Ser Phe Leu Gln Val Glu Asp
111

Pro Ser Asn Ser Ser Val Arg Gly Ala Val Asn Asp Leu
121

Leu Ala Lys Trp His Gln Asp Tyr Gly Gln Val Asn Asn
131 141

Val Pro Ala Arg Met Gln Tyr Glu Lys Ile Thr Ala His
151

Ser Met Glu Gln Leu Lys Val Lys Phe Gly Ser Asp Phe
161

Glu Lys Thr Gly Asn Ser Leu Asp Ile Asp Phe Asn Ser
171 181

Val His Ser Gly Glu Lys Gln Ile Gln Ile Val Asn Phe
191

Lys Gln Ile Tyr Tyr Thr Val Ser Val Asp Ala Val Lys
201

Asn Pro Gly Asp Val Phe Gln Asp Thr Val Thr Val Glu
211 221

Asp Leu Lys Gln Arg Gly Ile Ser Ala Glu Arg Pro Leu
231

[Handwritten signature]



Val Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr
241

Leu Lys Leu Glu Thr Thr Ser Lys Ser Asp Glu Val Glu
251

Trp
|
Ala Ala Phe Glu Ala Leu Ile Lys Gly Val Lys Val Ala
261 271

Phe
|
Pro Gln Thr Glu Trp Lys Gln Ile Leu Asp Asn Thr Glu
281

Val Lys Ala Val Ile Leu Gly Gly Asp Pro Ser Ser Gly
291

Ala Arg Val Val Thr Gly Lys Val Asp Met Val Glu Asp
301 311

Leu Ile Gln Glu Gly Ser Arg Phe Thr Ala Asp His Pro
321

Gly Leu Pro Ile Ser Tyr Thr Thr Ser Phe Leu Arg Asp
331

Asn Val Val Ala Thr Phe Gln Asn Ser Thr Asp Tyr Val
341 351

Glu Thr Lys Val Thr Ala Tyr Arg Asn Gly Asp Leu Leu
361

Arg
|
Leu Asp His Ser Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Tyr Ile
371

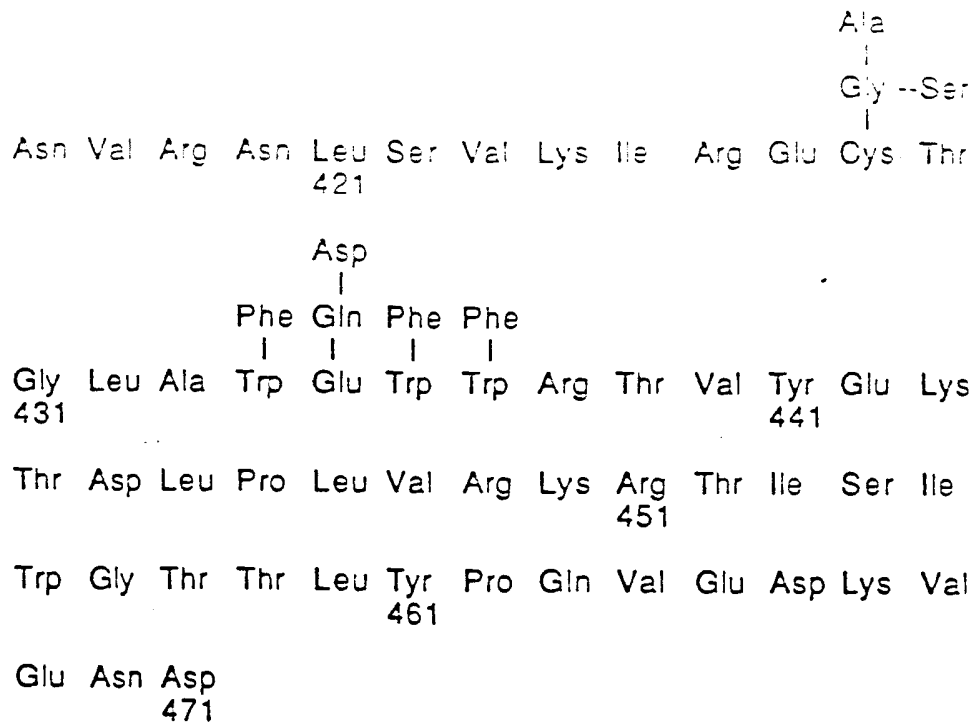
Phe Phe Asn
| |
Thr Trp Asp Glu Leu Ser Tyr Asp His Gln Gly Lys Glu
381

Phe
|
Val Leu Thr Pro Lys Ala Trp Asp Arg Asn Gly Gln Asp
391 401

Leu Thr Ala His Phe Thr Thr Ser Ile Pro Leu Lys Gly
411

4. ábra folytatás
BÁBIA
szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

7.



4. ábra folytatása

DANUBIA
 Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
 7.

