



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

219 682 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 95 03312
(22) A bejelentés napja: 1994. 05. 23.
(30) Elsőbbségi adatok:
08/065,725 1993. 05. 21. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 94/05779
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/27631

(51) Int. Cl.⁷

A 61 K 38/36

(40) A közzététel napja: 1996. 07. 29.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2001. 06. 28.

(72) Feltalálók:

Berkner, Kathleen L., West Seattle,
Washington (US)
Hart, Charles E., Brier, Washington (US)
Petersen, Lars Christian, Hoersholm (DK)

(73) Szabadalmazók:

NOVO NORDISK A/S., Bagsvaerd (DK)
ZYMOGENETICS Inc., Seattle, Washington (US)

(74) Képviselő:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54)

Módosított VII faktor

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás a szöveti faktornak a vérerek újbóli elzáródásának (resztenózis), a vérlemezek felgyűlésének gátlására, ami abból áll, hogy a betegnek olyan készítmény terápiás hatású mennyiségét juttatják be,

mely a katalitikus központjában legalább egy olyan módosítással rendelkező VII faktort tartalmaz, mely módosítás lényegében gátolja a VII faktor X vagy IX plazma-faktorokat aktiváló képességét.

HU 219 682 B

A jelen találmány antikoagulánsként alkalmazható fehérjékkel foglalkozik. Közelebbről, a jelen találmány a VII faktor olyan módosított alakjaival foglalkozik, melyek gátolják a véralvadást és a szöveti faktort.

A véralvadás különféle vérkomponenseknek vagy -faktoroknak bonyolult kölcsönhatásából álló folyamat, mely végül a fibrinalvadék megjelenéséhez vezet. A vérkomponensek, melyek részt vesznek a koagulációs „kaskád”-nak nevezett folyamatban, általában proenzimiek vagy zimogének, olyan enzimológiai inaktív fehérjék, melyek egy aktivátor – mely maga is egy aktivált alvadási faktor – hatására proteolitikus enzimekké alakulnak. Ezen az átalakuláson átment faktorokat, melyeket általában „aktív faktoroknak” neveznek, kis „a” betűvel jelölik (például VIIa faktor).

Aktivált X faktor („Xa”) szükséges ahhoz, hogy a protrombin trombinná alakuljon, amelyik azután a fibrinogént alakítja át fibrinné, ami a fibrinolvadék keletkezésének befejező lépése. Az X faktor aktiválására két rendszer vagy folyamat szolgál. Az „intrinsic” folyamat azokat a reakciókat jelenti, melyek a trombin keletkezését csak a plazmában lévő faktorok felhasználásával valósítják meg. A proteázok közvetítette aktivációk sorozata végül a IXa faktort eredményezi, mely a VIIa faktorról együtt a X faktort Xa faktorrá hasítja. Hasonló proteolízissel hat a véralvadás „extrinsic” folyamatában a VIIa faktor és kofaktora, a szöveti faktor. A szöveti faktor membránhoz kötött fehérje, és normális körülmények között nem található meg a plazmában. A vérér sérülésekor azonban összekapcsolódhat a VIIa faktorról, mely komplex Ca^{++} és foszfolipid jelenlétében katalizálja a X faktor vagy a IX faktor aktiválódását [Nemerson és Gentry, *Biochem.*, 25:4020–4033 (1986)]. Noha a két koagulációs folyamatnak a viszonyított jelentősége a hemostázisban nem ismert, az utóbbi években megállapították, hogy a VII faktornak és a szöveti faktornak kulcsszerepe van a véralvadás szabályozásában.

A VII faktor olyan nyomokban lévő plazma-glikoprotein, amelyik egyes láncú zimogénként kering a vérben. A zimogén katalitikusan inaktív [Williams és munkatársai, *J. Biol. Chem.*, 264: 7536–7543 (1989); Rao és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 6687–6691 (1988)]. Az egyes láncú VII faktort kettős láncú VIIa faktorrá alakíthatja át a Xa, XIIa, IXa faktor és a trombin in vitro. A Xa faktorról feltételezik, hogy a VII faktor fő fiziológiai aktivátora. Hasonlóan a hemostázisban részt vevő néhány más plazmaproteinhez, a VII faktor aktivitása is K-vitamin-függő, amennyiben a fehérje aminoterminalisán csoportba rendeződő glutaminsavak gamma-karboxilációja K-vitamint igényel. Ezekre a gamma-karboxilált glutaminsavakra a VII faktor foszfolipidekkel való kölcsönhatásánál van szükség, mely kölcsönhatásban fém vesz részt.

A VII faktor zimogén aktivált kettős láncú molekulává való átalakulása a molekula középtáján elhelyezkedő egyik belső peptidkötésének a felhasítása révén valósul meg. Az emberi VII faktor aktiválásának hasítóhelye az Arg₁₅₂–Ile₁₅₃ kötésnél van [Hagen és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 2412–2416 (1986);

Thim és munkatársai, *Biochem.*, 27: 7785–7793 (1988), mindkét cikk referenciaként beépített ezen bejelentésbe]. A szarvasmarha VII faktor ugyancsak az Arg₁₅₂–Ile₁₅₃ kötés hasításával aktiválódik [Takeya és munkatársai, *J. Biol. Chem.*, 263:14 868–14 877 (1988)]. Szöveti faktor, foszfolipidek és kalciumionok jelenlétében a kettős láncú VIIa faktor korlátozott proteolízissel gyorsan aktiválja a X és IX faktorokat.

Gyakran szükséges, hogy a beteg koagulációs kaskádját szelektíven blokkoljuk. Heparin, kumarin, kumarinszármazékok, indándionszármazékok és más hatóanyagok használhatók fel véralvadásgátlóként például a vesedialízis alatt, a mélyvénás trombózis kezelésére, a disszeminált intravaszkuláris koaguláció (DIC) kezelésére, és más egészségkárosodásban szenvedőknél. Így például dialízisnél heparinos vagy – testen kívül – citrátiós kezelés (4 500 309 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom) alkalmazható, hogy megakadályozzuk a dialízis alatt a véralvadást. Heparint használnak a mélyvénás trombózis megelőzésére is a sebészeti beavatkozásnak alávetett betegeknél.

A heparinnal vagy más antikoagulánsal történő kezelésnek azonban nem kívánt mellékhatásai lehetnek. A rendelkezésre álló antikoagulánsok általában az egész testben hatnak, és nem speciálisan az alvadék helyén. A heparin például súlyos vérzést okozhat. Továbbá a körülbelül 80 perces felezési ideje miatt a heparin gyorsan eltűnik a vérből, gyakori adagolást igényelve. Minthogy a heparin az antitrombin (AT III) kofaktorként működik, és az AT III gyorsan eltűnik a DIC kezelésekor, gyakran nehéz fenntartani a kellő heparindózist, és folyamatosan mérni kell az AT III és a heparin koncentrációját. Hatástalan a heparin akkor is, ha az AT III szintje extrém módon lecsökken. Továbbá a hosszabb ideig tartó heparinos kezelés fokozhatja a vérlemezek aggregációját is, csökkentve a vérlemezek számát, és közreműködik a csontritkulás kialakulásában. Az indándionszármazékoknak úgyszintén lehet toxikus mellékhatásuk.

A fent röviden ismertetett antikoagulánsokon túl, néhány természetes fehérjéről is megállapították, hogy véralvadásgátló hatásuk van. Így például Reutelingsperger (4 736 018 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom) a szarvasmarha aortájából és az emberi köldökvénából, artériákból izolált véralvadásgátló fehérjéket. Maki és munkatársai emberi méhlepényből származó antikoaguláns fehérjéket fedeztek fel (4 732 891 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom). Ezenkívül az AT III-t gyógyászati céllal antikoagulánsként ajánlják [Schipper és munkatársai, *Lancet*, 1 (8069):854–856 (1978); Jordan, 4 386 025 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom; Bock és munkatársai, 4 517 294 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom].

Ateroszklerózisnál az érelváltozás kialakulásában, az érrekonstrukció után vagy más érsérülésre való reagálásnál fontos esemény a simaizomsejtek osztódása a vérér falában. Így például az ateroszklerózis kezelése gyakran jelenti a blokkolt ér kiiktatását érplasztikával, endarterektómiával, redukciós aterektómiával vagy sőt beültetésével, vagyis olyan sebészeti eljárásokkal,

melyeknél az ateroszklerotikus „plakkokat” összenyomják vagy katéterezéssel eltávolítják (érplasztika), bemetszéssel eltávolítják a vérér falából (endarterektómia) vagy természetes vagy szintetikus vezetékkel áthidallják. Ezeknél az eljárásoknál eltávolítják a vérér endoteliumát, megsértik az alatta fekvő érbelhártyaréteget és elpusztulnak a tunica mediához tartozó simaizomszövetek. Az ilyen sérülést a simaizomszövetek szaporodása, és az érbelhártyába való migráció követi, ami jellemzően bekövetkezik néhány héten belül, és tarthat a sérülés utáni hatodik hónapig, majd leáll, ha a felső endoteliális réteg helyreállt. Embernél ezek az elváltozások 20% sejtből és 80% sejten kívüli állományból állnak.

Az érplasztikával, endarterektómiával vagy sönt beültetésével kezelt betegeknek körülbelül 30%-ánál vagy még nagyobb arányban a trombózis léphet fel és/vagy a simaizomsejtek érbelhártyában való szaporodása a vérér újbóli elzáródását és következésképpen a helyreállító műtét sikertelenségét eredményezi. A vérér műtétet követő ilyen elzáródását nevezik resztenózisnak.

Továbbra is igény van olyan javított antikoaguláns készítményekre, melyek viszonylag alacsony dózisban adhatók, és nem idézik elő azokat a nemkívánatos mellékhatásokat, melyek a hagyományos antikoaguláns készítményekkel járnak. A jelen találmány teljesíti ezt az igényt, olyan véralvadásgátlókat nyújtva, melyek specifikusan a sérülés helyén hatnak, további más előnyös tulajdonságaik is vannak.

A találmány tehát olyan új készítményekkel szolgál, melyek antikoaguláns tulajdonságokkal rendelkező, módosított VII faktort tartalmaznak. A módosított VII faktor készítmények a szöveti faktort is gátolják. A módosított VII faktor szekvenciájában legalább egy aminosavmódosítás van, ahol a módosítást úgy választjuk meg, hogy lényegesen csökkenjen az aktivált VII faktornak a X vagy XI plazmafaktorok aktiválását katalizáló képessége, és ezáltal képes legyen gátolni az alvadáást. Az új VII faktor aktív helye legalább egy aminosav cseréjével módosított, és ez a módosított forma képes kapcsolódni a szöveti faktorhoz. A módosított VII faktor készítmény általában a lényegében tiszta állapotban lévő anyag.

A találmány szerinti vegyületek különösen alkalmasak a különféle betegségekben szenvedők kezelésére, ha gyógyszerkészítmények alakjában adjuk be a véralvadással kapcsolatos állapotok kezelésére.

A módosított VII faktor molekuláknak, mely képesek megkötni a szöveti faktort, de lényegesen csökkent katalitikus képességük van más faktorok aktiválására a véralvadási kaszkádban, hosszabb felezési ideje lehet a plazmában, és ezáltal hosszabb a véralvadásgátló hatásuk, mint más antikoagulánsnak. A találmány szerinti vegyületek tehát olyan állapotok kezelésére javallottak, melyeknél rendszerint antikoagulánsokat alkalmaznak, mint például a mélyvénatrombózis, a tüdőembólia, a hűdés, a disszeminált intravaszkuláris koaguláció (DIC) és a szívinfarktus. A készítmények felhasználhatók a vérér újbóli szűkülésének vagy a vérlemezek lerakódásának és az említettekkel kapcsolatos rendellenességek-

nek a megakadályozására. A koagulációnak, a vérér újbóli beszűkülésének vagy a vérlemezek lerakódásának a megakadályozására szolgáló eljárás például abból áll, hogy a betegnek olyan módosított VII faktort tartalmazó gyógyszerkészítményt adunk be, mely faktor katalizist végző Ser₃₄₄, Asp₂₄₂ és His₁₉₃ triádjának legalább egyik aminosava kicserél. A kezeléshez olyan mennyiségű készítményt használunk, mely hatásosan gátolja a véralvadást, a vérér resztenózisát, illetve a vérlemezek lerakódását.

A humán célú gyógyszerkészítmények általában a módosított humán VII faktort és gyógyászati szempontból alkalmazható vivőanyagokat és puffereket tartalmaznak.

A humán és szarvasmarha VII faktor előnyösen az aktív hely Ser₃₄₄ aminosavánál módosított oly módon, hogy a Ser-t Gly-nel, Met-nal, Thr-nal vagy – legelőnyösebben – Ala-nal cseréljük ki. A csere történhet kizárólag az említett helyen vagy érintheti a katalitikus triád – melyhez hozzátartozik még a His₁₉₃ és az Asp₂₄₂ is – más helyét vagy helyeit is.

Egy másik szempontból a találmány azokra a polinukleotidmolekulákra vonatkozik, melyek két működőképesen kapcsolódó szekvenciából állnak. A két szekvencia kódolja a pre-pro-fehérjét és a K-vitamin-függő plazmaprotein gla-doménjét, illetve a lag-domén nélküli VII faktor proteint. Expresszállódáskor a nevezett polinukleotid olyan módosított VII faktor molekulát kódol, mely lényegesen nem aktiválja a X és a IX faktorokat, és képes kapcsolódni a szöveti faktorra. Az említett polinukleotid által expresszált módosított VII faktor molekula biológiailag aktív antikoaguláns, azaz képes gátolni a koagulációs kaszkádot és ezáltal a fibrinalvadék vagy fibrinrög kialakulását. Hogy a módosított VII faktort expresszáljuk, a polinukleotidmolekulát emlőssejtvonalba, például BHK, BH 570 vagy 293 sejtvonalba transzfektáljuk.

Az ábra a Ser₃₄₄ → Ala cserével módosított VII faktor DNS-szekvenciáját hordozó expressziós vektor felépítését mutatja. A használt jelölések: „0-1” az adenovírus 5 0-1 térképegység szekvenciája; „E” az SV40 enhancer; MLP az adenovírus fő késői promotere (major late promoter), SS a kapcsolóhelyek készlete; pA az SV40-ből származó poliadenilációs szignál a késői orientációban.

A jelen találmány új, módosított VII faktorra szolgál, melynek antikoaguláns aktivitása van. A VII faktor lehet zimogén alakjában (azaz egyes láncú molekula formájában) vagy az aktivációs helyén elhasított állapotban.

A módosított VII faktor készítményei alkalmasak az emberbe és különböző emlősökbe való bejuttatásra azzal a céllal, hogy gátoljuk a koagulációs kaszkádot. A módosított VII faktor beadható a betegeknek más antikoagulánsok kíséretében vagy azok helyett.

A VII faktor fontos szerepet játszik a véralvadás kaszkádjában, különösen vonatkozik ez az „extrinsic” folyamatra. Ha a keringő plazmában inaktív, egyes szá- lú zimogén fehérjeként lévő faktor aktiválódik, a VIIa faktor a szöveti faktorra és kalciumionokkal kombinál-

lódva a X faktort Xa faktorrá, a IX faktort IXa faktorrá aktiválja, ami végeredményként a fibrinalvadék keletkezéséhez vezet.

A jelen találmányban leírtak lehetőséget nyújtanak arra, hogy a koagulációs kaszkád eseménysorozatát meggátoljuk, megakadályozva a IX és X faktorok VIIa faktorttal való aktiválását. A találmány szerinti VII faktor protein katalitikus helye oly módon módosított, hogy ezáltal csökken a VIIa faktor katalitikus aktiválhatósága, noha a molekula továbbra is képes hozzákötődni a szöveti faktorhoz. A módosított VII faktor verseng a VII faktorttal és/vagy a VIIa faktorttal a szöveti faktorhoz történő kötődésért.

A jelen találmány egyik kivitelezési módja, hogy a katalitikus központ vagy triád kémiai származékképzésével gátoljuk a VII faktor katalitikus aktivitását. A származékképzéshez a VII faktort például irreverzibilis gátlóanyaggal – mint amilyen a szerves foszforvegyület, a szulfonil-fluorid, a peptid-halo-metil-ke-ton vagy az azapeptid – reagáltatjuk vagy acilezzük. Előnyös peptid-halo-metil-ke-ton a PPACK (D-Phe-Pro-Arg-klór-metil-ke-ton; lásd: 4 318 904 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom, mely a találmányba referenciaként beépített) és a DEGRck (denzil-Glu-Gly-Arg-klór-metil-ke-ton).

A találmány egy másik kivitelezési módjánál a VIIa faktor katalitikus aktivitását oly módon gátoljuk, hogy aminosavakat cserélünk ki, építünk be vagy ejtünk ki. Az előnyös kivitelezési módnál aminosavcsere történik a VII faktor katalitikus triádjának aminosavszekvenciájában. Katalitikus triádnak nevezzük a VIIa faktor katalitikus helyén közreműködő aminosavakat tartalmazó régiót. A katalitikus triádban a helyettesítés, beépülés vagy deléció általában azokat az aminosavakat érinti, vagy azon aminosavak szomszédságában történik, melyek a katalitikus helyet kialakítják. A humán és szarvasmarha VII faktor protein katalitikus „triádját” képező aminosavak: a Ser₃₄₄, Asp₂₄₂ és a His₁₉₃ (az index az aminosavnak a szekvenciában elfoglalt helyét jelzi). Más emlősfajok VII faktorának katalitikus helye a rendelkezésre álló technikákkal meghatározható, többek között a fehérjeizolálás és az aminosavszekvencia analízise útján. A katalitikus hely felderíthető oly módon is, hogy a szekvenciát más szeril-proteázok – főként a kimotripszin – szekvenciája mellé állítjuk, mely proteázok aktiv helyét előzőleg már meghatároztuk [Singler és munkatársai, J. Mol., Biol., 35: 143–164 (1968)]. Az aktív helyek megállapíthatók az analógiák alapján.

Az aminosav helyettesítését, beépítését vagy delécióját úgy hajtjuk végre, hogy ezzel meggátoljuk vagy másként megakadályozzuk a X és/vagy IX faktorok VIIa faktorttal való aktiválását. A VII faktort azonban úgy kell módosítani, hogy továbbra is megtartsa a valódi VII és/vagy VIIa faktorttal való versengését a koagulációs kaszkádban a szöveti faktorhoz kötődésért. Ez a versenyképesség könnyen megállapítható, például az itt leírt alvadási vizsgálattal vagy a kompetíciós kötődési vizsgálattal, ahol például olyan sejtvonalat használunk, amelynél a sejtfelszínen szöveti faktor található. Ilyen a humán J82 húgyhólyagkarcinóma-sejtvonal [So-

kai és munkatársai, J. Biol., Chem., 264: 9980–9988 (1989); referenciaként beépítve].

A humán és szarvasmarha VII faktor katalitikus helyét képező Ser₃₄₄, Asp₂₄₂ és His₁₉₃ aminosavak helyettesíthetők vagy kiejthetők. A jelen találmány szerint előnyös csak egyetlen aminosavat megváltoztatni, ezáltal csökkentjük annak valószínűségét, hogy nő a molekula antigén jellege, vagy hogy lehetetlenné tesszük a szöveti faktorhoz való kötődését. Elvégezhetjük azonban kettő vagy több aminosav megváltoztatását is (helyettesítést, hozzáadást vagy deléciót) és kombinálhatjuk is a helyettesítés(ek)e-t, a hozzáadás(oka)t és deléció(ka)t. Az emberi és szarvasmarha VII faktornál előnyös a Ser₃₄₄ aminosavat Ala aminosavval kicserélni, de helyettesíthetjük Gly, Met, Thr vagy más aminosavakkal is. Előnyös az Asp-t Glu-val és a His-t Lys-nel vagy Arg-nal helyettesíteni. Általában a helyettesítésnél az aminosavakat úgy kell megválasztani, hogy a fehérje harmadlagos szerkezete a lehető legkevésbé változzon. A helyettesítéshez használt aminosavak kiválasztásához eligazítást adhat Dayhoff és munkatársai modellje („Atlas of Protein Structure 1978”, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C.; referenciaként beépítve). Az ember a szarvasmarha vagy más faj megfelelő VII faktorának katalitikus helyén elvégezhetjük a fent leírt változtatásokat, és a nyert fehérjét az itt leírt módon megvizsgálhatjuk, hogy a kívánt mértékben gátolt-e a katalitikus aktivitása és rendelkezik-e anti-koaguláns hatással. A módosított VII faktor katalitikus aktivitása lényeges mértékben gátolt, általában gyengébb, mint a megfelelő faj természetes VII faktora aktivitásának 5%-a, de még előnyösebb, ha nem éri el az 1%-át.

A jelen találmány szerinti fehérjék a rekombinációs DNS-technikák alkalmazásával előállíthatók. Általában egy klónozott természetes VII faktor DNS-szekvenciát módosítunk oly módon, hogy a kívánt fehérjét kódolja. Ezt a módosított szekvenciát azután beépítjük egy expressziós vektorba, amivel a gazdasejtet transzformáljuk vagy transzfektáljuk. Előnyös gazdasejtek a magasabb rendű eukarióták sejtjei, különösen a tenyésztett emlőssejtek. Az ember VII faktor teljes nukleotid- és aminosavszekvenciája ismert. Lásd a 4 784 950 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmat (referenciaként a bejelentésbe beépítve), mely leírja a humán VII faktor klónozását és expresszálasát. A szarvasmarha VII faktor szekvenciáját Takeya és munkatársai írták le [J. Biol. Chem., 263: 14 868–14 872 (1988); referenciaként beépítve].

Az aminosavszekvencia megválasztására különféle eljárások állnak rendelkezésünkre. A DNS-szekvencia módosítása történhet helyspecifikus mutagenézissel. A helyspecifikus mutagenézis technikai jól ismertek a szakterületen, erre vonatkozó leírást találunk például Zoller és Smith cikkében [DNA; 3: 479–488 (1984)]. Ezek szerint a VII faktor nukleotid- és aminosavszekvenciájának a felhasználásával elvégezhetjük a választott változtatás(oka)t.

A találmány szerinti módosított VII faktor magában foglalja azokat a fehérjéket, melyek aminoterminális ré-

sze (gla domén) a K-vitamin-függő plazmaprotein IX faktor, a X faktor, a protrombin, a C protein, S protein vagy Z protein egyikének gla doménjével helyettesített. A K-vitamin-függő plazmaproteinek gla doménjét gamma-karboxi-glutaminsavak jelenléte jellemzi, és általában 30–40 aminosav hosszúságú, olyan C-terminálissal, ami megfelel az exon-intron határok helyének az illető génekben. A heterogén gla doménnel rendelkező VII faktor előállítására szolgáló eljárásokat a 4 784 950 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom (referenciaként beépítve) írja le.

A jelen találmányban felhasznált DNS-szekvenciák általában egy pre-pro-peptidet kódolnak a VII faktor protein amino-terminálásánál, hogy a megfelelő poszt-transzlációs folyamatot (például a glutaminsavak gamma-karboxilálódását) és a gazdasejtől való kiválasztódást elérjük. A pre-pro-peptid lehet a VII faktoré vagy más K-vitamin-függő plazmaproteiné, mint amilyen a IX faktor, a X faktor, a protrombin, a C protein vagy az S protein. Amint az a szakemberek előtt világos, a módosított VII faktor aminosavszekvenciájának további módosításai is elvégezhetőek, amennyiben ezek a változtatások lényegesen nem rontják a fehérje vérárvadásgátló hatását. Így például a katalitikus triádban módosított VII faktor megváltoztatható az aktivációs hasítóhelyen is, hogy ezzel megakadályozzuk a VII faktor zimogénjének aktivált kettős láncú alakba való átalakulását. Ilyen eljárást ír le az 5 288 629 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom (referenciaként beépítve).

A jelen találmányban alkalmazott expressziós vektorok a klónozott gén vagy cDNS transzkripcióját irányítani képes promotert tartalmaznak. A tenyésztett emlőssejtek esetében előnyösek a víruspromoterek és a sejtpromoterek. A víruspromoterekhez tartozik az SV40 promoter [Subramami és munkatársai, *Mol. Cell. Biol.*, 1: 854–864 (1981)] és a CMV promoter [Boshart és munkatársai, *Cell*, 41: 521–530 (1985)]. Különösen előnyös víruspromoter az adenovírus 2-ből származó fő késői promoter [Kaufman és Sharp, *Mol. Cell. Biol.*, 2: 1304–1319 (1983)]. A sejtpromoterek közé tartozik az egér kappa-gén-promotere [Bergman és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 7041–7045 (1983)] és az egér V_H -promoter [Loh és munkatársai, *Cell*, 33: 85–93 (1983)]. Különösen előnyös sejtpromoter az egér metallothionein-I promoter [Palmiter és munkatársai, *Science*, 222: 809–814 (1983)]. Az expressziós vektorok tartalmazhatnak RNS-illeszkedési helyeket is a promotertől lefelé és magától a VII faktor szekvenciájának inszerciós helyétől felfelé. Előnyös RNS-illeszkedési helyek nyerhetők az adenovírus- és/vagy immunoglobulin-génekből. Ugyancsak tartalmaznak az expressziós vektorok egy poliadenilációs szignált az inszerciós helytől lefelé elhelyezkedve. Különösen előnyös poliadenilációs szignál az SV40 korai vagy késői poliadenilációs szignálja (Kaufman és Sharp, lásd fent), az adenovírus 5 E/b régió poliadenilációs szignálja, a humán növekedéshormon-gén terminátor [DeNoto és munkatársai, *Nuc. Acids Res.*, 9: 3719–3730 (1981)] vagy a humán és szarvasmarha VII faktor gén poli-

adenilációs szignálja. Az expressziós vektorok tartalmazhatnak nem kódoló vírusleader-szekvenciát is, mint amilyen az adenovírus 2 háromrészi leadere, a promoter és az RNS-illeszkedési helyek között elhelyezkedve; továbbá enhancerszekvenciát, mint amilyen az SV40 enhancere.

A tenyésztett emlőssejtbe a klónozott szekvenciát például kalcium-foszfát közvetítette transzfekcióval [Wigler és munkatársai, *Cell*, 14: 725–732 (1978); Corsaro és Pearson, *Somatic Cell Genetics*, 7: 603–616 (1981); Graham és Van der Eb, *Virology*, 52d: 456–467 (1973)] vagy elektroporációval [Neumann és munkatársai, *EMBO J.*, 1: 841–845 (1982)] juttatjuk be. Az exogén DNS-t expresszálni sejtek azonosítására és szelektálására a kérdéses gén vagy cDNS mellett általában beviszünk egy gént, ami egy szelektálható fenotípust biztosít (szelektálómárker). Előnyös szelektálómárkerek közé tartoznak azok a gének, melyek hatóanyagokkal – például neomicin, higromicin és metotrexát – szembeni rezisztenciát nyújtanak. Előnyös amplifikálható szelektálómárker a dididrofolát-reduktáz (DHFR) szekvenciája. A szelektálómárkerek áttekintését adja Thilly („Mammalian Cell Technology”, Butterworth Publishers, Stanham, MA; referenciaként beépítve). A szelektálómárkerek választéka jól ismert a szakemberek előtt.

A szelektálómárkerek bevihetők a sejtbe a kérdéses gén bevitelével egy időben egy külön plazmidon vagy ugyanazon a plazmidon. Ha ugyanabban a plazmidban helyezkednek el, a kérdéses gén és a szelektálómárker lehet különböző promoter vagy közös promoter irányítása alatt, az utóbbi elrendezés egy dicisztronos üzenetet eredményez. Az ilyen típusok felépítése ismert a szakterületen [például Levinson és Simonsen, 4 713 339 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom]. Ugyancsak előnyös lehet „carrier-DNS”-ként ismert járulékos DNS-t is bejuttatni a sejtekbe.

Miután a sejtek felvették a DNS-t, megfelelő tápközegben tenyésztjük őket általában 1–2 napig, hogy megkezdődjön a kérdéses gén expressziója. A „megfelelő tápközeg” kifejezés olyan közeget jelent, mely tápanyagokat, valamint a sejtek növekedéséhez és a módosított VII faktor génjének kifejeződéséhez szükséges más alkotórészeket tartalmaz. A közeg általában szénforrást, nitrogénforrást, esszenciális aminosavakat, fehérjét és növekedési faktorokat tartalmaz. A gamma-karboxilált módosított VII faktor előállításához a közeg tartalmaz még K-vitamint, előnyösen 0,1–5 µg/ml koncentrációban. Ezután végezzük el a hatóanyag-szelekciót, hogy kiválaszthassuk azokat a sejteket, melyek stabil módon expresszálnak a szelekciós markert. Azoknál a sejteknél, ahol amplifikálódó szelekciós markert transzfektáltunk, növelhetjük a hatóanyag-koncentrációt, hogy a klónozott szekvenciák példányszámát meg-növeljük, és ezáltal a kifejeződés mértékét fokozzuk. A stabilan transzfektált sejtek klónjait ezután szűrővizsgálatnak vetjük alá a módosított VII faktor expresszáldása szempontjából.

A jelen találmány számára előnyös emlőssejtvonalak: a COS-1 (ATCC CRL 1650), a hörsögüjszülőtt-vesesejtvonal (BHK) és a 293 sejtvonal [ATCC CRL

1573; Graham és munkatársai, *J. Gen. Virol.*, 36: 59–72 (1977)]. Előnyös BHK-sejtvonal a tk-ts13 BHK-sejtvonal [Waechter és Baserga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:1106–1110 (1982); referenciaként beépítve], amit a továbbiakban itt BHK 570 sejtekként említünk. A BHK 570 sejtvonal az American Type Culture Collectionben (12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852) van letétbe helyezve ATCC CRL 10314 lajstromszámon. Ezen túlmenően számos más sejtvonal is felhasználható a találmányhoz, ideértve a Rat Hep I (patkányhepatóma; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (patkányhepatóma; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), humán tüdősejt (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), CHO (ATCC CCL 61) és a DUKX sejteket [Urlanb és Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216–4220 (1980)].

A jelen találmány szerint előállított módosított VII faktor anti-VII faktor antitestoszlopon tisztítható affinitáskromatográfiával. Különösen előnyösek a kalciumfüggő monoklonális antitestek, amint azt Wakabayashi és munkatársai [*J. Biol. Chem.*, 261: 11 097–11 108 (1986)] és Thim és munkatársai [*Biochem.*, 27: 7785–7793 (1988)] (mindkettő referenciaként beépítve) leírják. További tisztítás érhető el a szokásos kémiai tisztítási eljárásokkal, például HPLC-vel. Más tisztítási eljárások is ismertek a szakterületen és felhasználhatók a módosított VII faktornak tisztítására (általános összefoglaló: Scopes, R. „Protein Purification”, Springer-Verlag, N. Y., 1982). Gyógyászati célra előnyös 90–95%-os vagy még előnyösebb 98–99%-os vagy még homogénebb, lényegében tiszta módosított VII faktort használni. Ha a VII faktort részlegesen vagy kellő homogenitásig tisztítottuk, felhasználható terápiás célra.

A találmány egyik megvalósítási módjánál a VII faktort az aktivációs helyénél hasítjuk, átalakítva a kettős láncú alakjává. Az aktiválás a szakterületen ismert módszerrel elvégezhető, például a referenciaként beépített alábbi leírások szerint: Osferud és munkatársai, *Biochemistry*, 11: 2853–2857 (1972); Thomas, 4 456 591 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom; Hedner és Kiesel, *J. Clin. Invest.*, 71: 1836–1841 (1983); vagy Kiesel és Fujikawa, *Behring Inst. Mitt.*, 73: 29–42 (1983). A nyert módosított „VIIa faktort” azután az alábbiakban leírt módon készítménnyé feldolgozzuk és adagoljuk.

A találmány szerinti módosított VII vagy VIIa faktor vagy ezek gyógyszerkészítményei különösen alkalmasak embernél az intravaszkuláris koagulációval kapcsolatos különböző állapotok kezelésére. Így például, noha a mélyvénás trombózis és a tüdőembólia a hagyományos véralvadást gátlókkal kezelhető, az itt ismertett módosított VII vagy VIIa faktor felhasználható a magas rizikófaktorú betegeknek, például akik műtéti beavatkozáson esnek át vagy pangásos szívelégtelenségben szenvednek, a trombuszembóliás komplikációk megelőzésére. Továbbá a módosított VII vagy VIIa faktor antagonistaként működhet a szöveti faktor által kiváltott koagulációnál, gátolva a trombin termelődését és ezáltal a fibrin kiválását. A módosított VII vagy VIIa

faktor a szöveti faktor aktivitásának blokkolásán keresztül képes megakadályozni például a véralvadást, a trombózt vagy a vérlemezek lerakódását.

A találmány szerinti módosított VII vagy VIIa faktor különösen alkalmas az akut érsérülés következtében előálló érbelhártya-túlfejlődés vagy újbóli beszűkülés kezelésére. Az akut érsérülés gyorsan (néhány naptól néhány hónapig) zajlik le, ellentétben a krónikus érsérüléssel (például ateroszklerózis), ami a beteg élete folyamán alakul ki. Az akut érsérülést gyakran okozza sebészeti beavatkozás, például vérér-rekonstrukciók, ahol angioplasztikát, endarterektómiát, atrektómiát, érbeültetést vagy hasonló technikát alkalmaznak. A szöveti túlfejlődés (hiperplázia) kialakulhat utólagos válaszként is, például vérérbeültetésnél vagy szervátültetésnél. Minthogy a módosított VII faktor specifikusabb, mint a heparin, általában csak ahhoz a szöveti faktorkhoz kötődik, mely a sérülés helyén válik erre kitétté, és minthogy a módosított VII faktor más koagulációs fehérjéket nem károsít, hatása erősebb, és kisebb a valószínűsége, hogy olyan vérzési komplikációkat okoz, mint a heparin, ha a mélyvénás trombózis megelőző megakadályozására használjuk. Egy 70 kg-os betegnél a mélyvénás trombózis gátlására szolgáló napi dózis 50 µg és 25 mg között van, előnyösen 1–10 mg. Az adagolást a sebészeti beavatkozást legalább 6 órával megelőzően kell elkezdni, és folytatni kell legalább addig, amíg a megműtött járóbeteggé nem válik. A resztenózis kezelésére használt módosított VII vagy VIIa faktor dózisa betegenként változik, de általában a fent megadott dózistartományba esik.

A koszorúér-betegségek kezelésének jelenlegi törekvése a mechanikus beavatkozás felé mutat, amikor is eltávolítják vagy helyettesítik a zavarokat okozó plakkanyagot, azzal a céllal, hogy helyreállítsák a szükséges véráramot a szívkoszorú-verőérben. A mechanikai beavatkozás változatos formái ellenére – ideértve a ballon-érplasztikát, a reduktív ateroektómiát, az érszűkületes szakaszok kicserélését, a lézertechnikát vagy a roto-blattot – ezek a technikák hatékonysága korlátozott, minthogy a kezelést követő 6 hónapon belül az esetek körülbelül 40%-ánál újbóli beszűkülés (resztenózis) lép fel.

A resztenózisról úgy vélik, hogy biológiai folyamatok összetett kölcsönhatásának az eredménye, ideértve a vérlemezek leülepedését és a vérrögképződést, a kemotaxisos és mitogénfaktorok felszabadulását, a vérér simaizomsejtjeinek a dilatált artériaszegmens érbelhártyájába való migrációját és szaporodását.

A vérlemezek mechanikai sérülés helyén történő felhalmozódásának gátlásával korlátozni lehet embernél a resztenózis mértékét. A GPIIb/IIIa monoklonális vérlemezantitestek terápiás felhasználása képes korlátozni embernél a resztenózis mértékét [Califf és munkatársai, *N. Engl. J. Med.*, 330: 956–961 (1994)]. Az antitestek hozzákötődnek a vérlemezek felületén lévő GPIIb/IIIa receptorokhoz, és ezáltal megakadályozzák a vérlemezek összegyűlését. Ezek az adatok arra utalnak, hogy ha az emberi szívkoszorú-verőérben a mechanikai sérülés helyén gátoljuk a vérlemezek felhalmozó-

dását, az jótékony hatással van az események végső kimenetelére. Noha az akut érsérülések helyén vérlemezek felhalmozódása történik, ezeken a helyeken a trombinképződés lehet a felelős a vérlemezek aktiválódásáért és az ezt követő összegyűlésükért.

Amint az alábbi példák mutatják, a jelen találmány szerinti módosított VIIa faktor képes hozzákötődni a sejtfelszíni szöveti faktorhoz. Így például a DEGR-VIIa faktor ugyanolyan vagy még nagyobb affinitással kötődik a sejtfelszíni szöveti faktorhoz, mint a természetes VIIa faktor. A DEGR-VIIa faktornak azonban nincs enzimatis aktivitása, mégis hozzákötődik a szöveti faktorhoz, és a természetes VIIa faktor kompetitív antagonistaként működik, ezáltal megakadályozza a trombin keletkezéséhez vezető koaguláció extrinsic folyamatának további lépéseit.

A szöveti faktorhoz kötődő, találmány szerinti módosított VIIa faktor molekulák megakadályozzák az érsérülés helyén a vérlemezek felhalmozódását, blokkolva a trombinképződést és a fibrin ezt követő keletkezését.

Annak köszönhetően, hogy a DEGR-VIIa faktor az akut érsérülés helyén blokkolja a trombin keletkezését és korlátozza vérlemezek leülepedését, megőrzi ugyan a szöveti faktorhoz való kötődési képességét, de elveszti a VIIa faktor enzimatis aktivitását, felhasználható a vérér újbóli beszűkülésének megakadályozására.

A megállapított mélyvéna trombózisnál és/vagy tüdőembóliánál a módosított VII faktor feltöltő napi dózisa 50 µg és 25 mg között, a fenntartó napi dózisa pedig 500 µg és 10 mg között van a beteg testsúlyától és az állapot súlyosságától függően. Minthogy a módosított VII faktor infúziójánál a vérzéssel kapcsolatos komplikációknak kisebb a valószínűsége, a trombektómiát vagy embolektómiát alkalmazó sebészeti beavatkozások alatt vagy után a módosított VII faktor helyettesítheti vagy csökkentheti a heparindózist.

A jelen találmány szerinti módosított VII faktor készítmények ugyancsak felhasználhatók a szívembólia megakadályozására és a trombózis rohamok kezelésére. A vérzéses komplikációk alacsony valószínűsége és a módosított VII faktor szelektivitása miatt a módosított VII faktor beadható a roham áldozatának, és megakadályozhatja az elzáródásos artériatrombusz kiterjedését. A módosított VII faktor beadott mennyisége betegenként változik a roham természetétől és súlyosságától függően, de általában az alábbiakban megadott tartományba esik.

A módosított VII faktor gyógyszerkészítményei alkalmasak az akut miokardiális infarktus kezelésére, minthogy a módosított VII faktor in vivo gátolja a koagulációt. A miokardiális infarktus akut fázisa alatt a módosított VII faktor beadható szöveti plazminogén aktivátorral vagy sztreptokinázzal. Akut miokardiális infarktusnál a módosított VII faktor feltöltő napi dózisa legalább 1–25 mg, a fenntartó napi dózis 500 µg és 10 mg között van.

A jelen találmány szerinti módosított VII faktor alkalmas a disszeminált intravaszkuláris koaguláció

(DIC) kezelésére. A DIC-ben szenvedő betegre jellemző, hogy sok hajszáleres vérrög alakul ki és gyakran súlyos vérzési problémák jelentkeznek az esszenciális alvadási faktorok megfogyatkozása miatt. A szelektivitásnak köszönhetően a módosított VII faktor nem súlyosbítja a DIC-cel járó vérzési problémákat, mint azt a hagyományos antikoagulánsoknál tapasztalhatjuk, sőt csökkenti vagy meggátolja a további fibrinalvadékok keletkezését a hajszálérhálózatban.

A gyógyszerkészítmény aszerint állítható össze, hogy parenterálisan, helyileg vagy lokálisan kívánjuk alkalmazni megelőző és/vagy gyógykezelési céllal. A gyógyszerkészítményt előnyös parenterálisan bejuttatni, azaz intravénásan, szubkután vagy intramuszkulárisan. Parenterális bevitelhez a találmány szerinti készítmény a módosított VII faktor megfelelő hordozóban, előnyösen vizes közegben készült oldatából áll. A vizes közeg különféle lehet, például víz, puffertolt víz, 0,4%-os sóoldat, 0,3%-os glicinoldat és hasonló. A módosított VII faktort liposzómakészítményként is célba juttathatjuk a sérülés helyéhez.

A liposzómapreparátumokat a referenciaként itt beépített 4 837 028, 4 501 728 és 4 975 282 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmak írják le. A készítmények a hagyományos, jól ismert technikákkal sterilizálhatók. A nyert vizes oldatot felhasználásra készen csomagolhatjuk vagy aszeptikus körülmények között szűrjük, fagyaszttva szárítjuk, és a szárított preparátumból a felhasználás előtt steril vizes oldatot készítünk. A készítmények gyógyászati szempontból alkalmazható adalékanyagokat tartalmazhatnak, melyek a megfelelő fiziológiai körülményeket biztosítják, így pH-beállító és puffertoló ágenseket, ozmotikus körülményeket beállító ágenseket és hasonlókat. Ilyen célra használható például a nátrium-acetát, nátrium-laktát, nátrium-klorid, kálium-klorid, kalcium-klorid stb. A módosított VII faktor koncentrációja ezekben a készítményekben széles határok között változhat, általában kevesebb, mint 0,5%-tól 15 vagy 20 tömeg%-ig, rendszerint azonban a koncentráció 1% vagy legalább 1%. A koncentrációt elsősorban a folyadék térfogata, viszkozitása stb. határozza meg összhangban a bevitel választott módjával.

Az intravénás infúzióra szolgáló tipikus gyógyszerkészítmény 250 ml steril Ringer-oldatot és 10 mg módosított VII faktort tartalmaz. A parenterálisan bevihető készítmények elkészítésének tényleges módszerei jól ismertek és nyilvánvalóak a szakterületen; részletesebb leírásuk például megtalálható a „Remington's Pharmaceutical Science” kézikönyvben [16. kiadás, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA (1982); referenciaként beépítve].

A módosított VII faktort tartalmazó készítmények alkalmazhatók megelőző és/vagy terápiás kezelési céllal. Terápiás céllal akkor adjuk be a készítményt a kezelendő személynek, ha az a fent nevezett betegségek valamelyikében szenved. Olyan mennyiséget alkalmazunk, ami elegendő a gyógyításhoz vagy legalább a betegség vagy komplikáció lefékezéséhez. Azt a mennyiséget, mely ezekhez szükséges „terápiásan hatásos dózisnak” nevezzük. A tényleges mennyiség függ a beteg

ség vagy sérülés súlyosságától, a beteg súlyától és általános állapotától, de a módosított VII faktor napi dózisa egy 70 kg testsúlyú személynél nagy általánosságban 0,5–10 mg. Figyelembe kell azonban venni, hogy a találmány szerinti hatóanyagokat súlyos betegségekben vagy sérült állapotokban használjuk. Ilyen esetekben figyelembe véve azt is, hogy idegen anyagról van szó, ami ugyan minimalizálja a mennyiséget, de a módosított VII faktor immunogenitási problémákat embernél nem okoz, és a kezelőorvos szükségét érezheti, hogy a módosított VII faktor készítményét lényeges feleslegben adja be.

Megelőzéses alkalmazásnál a módosított VII faktort tartalmazó készítményeket akkor adjuk be a páciensnek, ha hajlamos a betegségre vagy sérülésre vagy egyéb más okból az ilyen veszély fennáll. Ezzel fokozzuk a kezelt személy saját antikoagulatív képességeit. Az ekkor használt mennyiséget nevezzük „megelőző hatású dózissnak”. Ennek pontos mennyisége ugyancsak a páciens egészségi állapotától és testtömegétől függ, de egy 70 kg-os embernél a napi adag 0,1–25 mg, leginkább 0,5–10 mg.

A készítményt beadhatjuk egyszeri vagy osztott adagban, mely beosztást a kezelőorvos szabja meg. Járóbetegknél, akik napi szint fenntartását igénylik, a módosított VII faktor beadható folyamatos infúzióval, például egy hordozható pumparendszer segítségével. A módosított VII vagy VIIa faktor lokális célhoz vivése elvégezhető például perfúzióval, kettős ballonkatéterrel vagy más jól bevált módszerrel. Minden esetben a gyógyszerkészítménynek a találmány szerinti módosított VII faktor olyan mennyiségét kell tartalmaznia, mely elegendő a beteg hatásos kezeléséhez.

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

1. példa

A Ser₃₄₄ → Ala₃₄₄ VII faktor expresszálása

A Ser₃₄₄ → Ala₃₄₄ VII faktor aktív hely mutáns előállításához az FVII (565+2463)/pDX plazmidot [4 784 950 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalom; lajstromszám ATCC 40205] XbaI és KpnI enzimekkel emésztjük, és a 0,6 kb nagyságú fragmenst, mely a szerin₃₄₄ régiót tartalmazza, kinyerjük. Ezt a fragmenst az ábrán bemutatott módon beklónozzuk az XbaI és KpnI enzimekkel hasított M13mp19 vektorba. Ezt és az alábbiakban következő lépéseket általában a szokásos protokollok szerint hajtjuk végre [például Maniatis és munkatársai, „Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA (1982); referenciaként beépítve].

Az M13 templáton a mutagenézist Zoller és Smith (lásd fent) módszerével hajtjuk végre, mutagén ZC1656 oligonukleotidot (5' TGG GCC TCC GGC CTG CCC CTT 3') és az „univerzális” ZC87 második primert (5' TCC CAG TCA CGA CGT 3') használva. A reakciótermékek szűrővizsgálatát kinázzal kezelt

ZC1656 felhasználásával végezzük. A pozitív plakkokat felvesszük, a templát DNS-t kipreparáljuk, és szekvenáljuk PstI 1077 hasítóhelytől KpnI 1213 hasítóhelyig. A mutáns klónt 1656 jelöléssel láttuk el.

A 1656 klónt felhasználva, elkészítünk egy expressziós vektort. Az M13 vektorból körülbelül 0,14 kb nagyságú PstI/KpnI fragmensként izoláljuk a mutagenizált szekvenciát. Ezt a fragmenst hozzáigáljuk az FVII(565+2463)/pDX-ből származó, 1,7 kb nagyságú HindIII/XbaI fragmenshez, az FVII(565+2463)/pDX-ből származó, 0,5 kb nagyságú XbaI/PstI fragmenshez és az FVII(565+2463)/pDX-ből származó, 4,3 kb nagyságú KpnI/HindIII fragmenshez, amint azt az ábra mutatja. A kívánt mutánsszekvencia jelenlétének megerősítésére a mutáns és a vad típusú klónokat PstI enzimmel, az M13 mutáns VII faktor inzertjét KpnI és XbaI enzimekkel hasítjuk, a hasított DNS-nek elkészítjük a Southern-blotjait és a sávokat radioaktívan jelzett ZC1656 próbával detektáljuk.

A 1656 expressziós vektor két izolátumával (#544 és #545-ként jelöltük) transzfektáljuk a hörcsögüjszülött BHK 570 vesesejtvonalat (az American Type Culture Collectionben 1034 lajstromszámon letéve). A sejtek előkészítéséhez egy 10 cm-es tenyészedényben lévő BHK 570 sejtekkel összefüggően benőtt tenyészetet 1:10 arányban hígítunk 5 db 10 cm-es tenyészedényben lévő nem szelektív tápközegben [10% fetális borjúsérumot és 1% PSN antibiotikumkeveréket (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)]. 24 óra elmúltával, amikor a sejtek benövik a felület 20–30%-át, a sejteket kotranszfektáljuk a 1656 mutációt kódoló expressziós vektor egyik izolátumával, p468 plazmiddal [összetétele: Adenovírus 5 ori, SV40 enhancer, Adenovírus 2 fő késői promotor, Adenovírus 2 háromrészes leader, 5' és 3' hasítóhelyek, a DHFR^r cDNS és SV40 poliadenilációs szignál pML-1-ben (Lusky és Botchan, Nature, 293: 79–81 (1981))] és 10 µg karrier DNS-sel (ultrahanggal feltárt lazacsperma-DNS), amint azt az I. táblázatban mutatjuk. A DNS-t egy 15 ml-es kémcsőbe visszük, hozzáadunk 0,5 ml 2×Hepes (25 g Hepes, 40 g NaCl, 1,8 g KCl, 0,75 g Na₂HPO₄·2 H₂O, 5 g dextróz, desztillált vízzel feltöltve, 2,5 l-re; kémhatás beállítva pH=6,95–7,0 értékre), és a cső tartalmát összekeverjük. 0,5 ml 0,25M CaCl₂ hozzáadásával a DNS-t lecsapjuk, miközben egy Pasteur-pipettával levegőt buborékolatunk át a DNS/Hepes oldaton. A csövek tartalmát vortexszel összekeverjük, szobahőmérsékleten 15 percen át inkubáljuk, és vortexszel ismét megkevertetjük. A DNS-keveréket pipettával cseppenként hozzáadjuk a tenyészedényekhez. A tenyészedényeket gyengén megkevertetjük, és 37 °C hőmérsékleten inkubálunk 4–6 órán keresztül. Az inkubálás után 2 ml Tris-sóoldatban (0,375 g KCl, 0,71 g Na₂HPO₄, 8,1 g NaCl, 3,0 g Tris-HCl, 0,5 szacharóz, feltöltve 1 l-re, kémhatás beállítva pH=7,9 értékre) elkészített 20%-os glicerinsóoldatot adunk minden tenyészedényhez. A tenyészedények tartalmát megforgatva megkeverjük, és szobahőmérsékleten hagyjuk állni 2 percen át. Ezután a tápközeget eltá-

volítjuk a tenyészedényből, és 2 ml Tris-sóoldattal cseréljük ki. A tenyészedényeket 2 percen át szobahőmérsékleten hagyjuk állni, majd a Tris-sóoldatot eltávolítjuk, és kicseréljük 10 ml nem szelektív tápközzel. A tenyészeteket 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk 2 napon keresztül.

I. táblázat
Transzfekció*

A plazmid neve	544	545	544 kontroll	545 kontroll
# 544 klón	15 µl	–	15 µl	–
# 545 klón	–	30 µl	–	30 µl
p486	1,5 µl	1,5 µl	–	–
Hordozó DNS	1,6 µl	1,6 µl	1,6 µl	1,6 µl

* az alkalmazott DNS-koncentrációk: # 544 klón: 0,7 µg/ml

545 klón: 0,3 µg/ml

P486: 1,49 µg/ml

A kétnapos inkubáció után a sejteket szelekciós tápközzel (10% dializált fetális borjuszérumot, 1% PSN antibiotikus keveréket és 150 nM methotrexátot tartalmazó DMEM) hígítjuk, és 1:100, 1:250 és 1:500 arányú hígítás mellett maxi tenyészedényekbe visszük. A tenyészeteket 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk egy héten át. Egy hét elmúltával a tápközzel szelekciós közzel kicseréljük, és ellenőrizzük a telepkepződést.

Nyolc nappal később, a telepkepződés után 12 telepet véletlenszerűen kiválasztunk az #544 és #545 transzfekciós tenyészetek 1:500 arányban hígított edényeiből. Az egyes klónokat hatluk lemez egyes lukába helyezzük, és szelekciós tápközzel növesztjük. Hét nap múlva a tenyészetek összefüggően benövik a felületet, és a klónokat 10 cm-es edényekbe csúsztatjuk át szelekciós tápközzel.

A fent leírt klónokat és kontrollsejteket, melyeket úgy transzfektáltunk, hogy a vad típusú VII faktort expresszálják, metabolikusan jelöljük ³⁵S-Methionine-Cysteine Protein Labeling Mixszel (NEN DuPont Biotechnology Systems; Wilmington, DE, USA). A klónokat kinövesztjük, és szelektív közzel a pulzusjelöléses kísérletekhez előkészítjük. A sejteket foszfáttal pufferolt sóoldatban (Sigma St. Louis, MO, USA) átöblítjük, és 4 órán át 20 µCi/ml ³⁵S-Cys-³⁵S-Met jelenlétében pulzusjelölésnek tesszük ki. Négy óra elteltével a felülűzöt és a sejteket elválasztjuk. A sejteket Lenk és Penman által leírt módszerrel lízáljuk [Cell, 16: 289–302 (1979)], és minden lízátumból 400 µl-t előtisztítunk 50 µl staph. A-val (Sigma, St. Louis, MO, USA).

A metabolikusan jelölt sejtekből vett mintákat radioimmunoprecipitációval (RIP) lecsapjuk, a mintákat először 4 órán át 6 µl anti-VII faktor poliklonális antiszérummal inkubálva. Mindegyik mintához hozzáadunk 60 µl mosott Staphylococcus protein A-t, és a mintákat 1,5 órán át, 4 °C hőmérsékleten himbálással kevertetjük. A mintákat centrifugáljuk, és a felülűzöt eltávolítjuk. Az üledéket kétszer mossuk 0,7M RIPA pufferrel

[10 mM Tris, pH=7,4; 1% deoxikólsav (Calbiochem Corp., La Jolla, CA, USA), 1% Triton X-100, 0,1% nátrium-dodecil-szulfát, 5 mM EDTA, 0,7M NaCl], egyszer mossuk 0,15M RIPA pufferrel [10 mM Tris, pH=7,4; 1% deoxikólsav (Calbiochem Corp., La Jolla, CA, USA), 1% Triton X-100, 0,1 nátrium-dodecil-szulfát, 5 mM EDTA, 0,15M NaCl]. 100 µl 1×SDS festéket (50 mM Tris-HCl, pH=6,8; 100 mM ditio-treitol, 2% nátrium-dodecil-szulfát, 0,1% bróm-fenolkék, 10% glicerol) adunk minden mintához, 5 percen át forraljuk a mintákat, majd centrifugálással eltávolítjuk a proteina-t. Mindegyik mintából 50 µl-t futtatunk 10%-os poliakrilamidgelen. Az eredmények azt mutatják, hogy 10 klón közül 9 termelt módosított faktort.

2. példa

A módosított VII faktor antikoaguláns aktivitása

A módosított VII faktor alvadást gátló aktivitását egy egy lépéses alvadásvizsgálattal mérjük, vad típusú VII faktort használva kontrollként. A rekombináns fehérjét lényegében a fentiekben leírtak szerint készítjük el 5 µg/ml K-vitamint tartalmazó tápközzel kinövesztett tenyészet sejtjeiből. Különböző mennyiségű módosított VII faktort (a #544 klónból) vagy rekombináns vad típusú VII faktort 100 µl-re hígítunk 50 mM Tris-pufferben, pH=7,5, ami 0,1% BSA-t tartalmaz. Az elegyet 100 µl VII faktor deficiens plazmával (George King Bio-Medical Inc., Overland Park, KS, USA) és 200 µl tromboplasztin C-vel (Dade, Miami, FL, USA; nyúlgytromboplasztint és 11,8 mM Ca²⁺-t tartalmaz) inkubáljuk. Az alvadási vizsgálatot automata koagulációmérővel (MLA Electra 800, Medical Laboratory Automation Inc., Pleasantville, NY, USA) végezzük, és az alvadási időt átszámítjuk VII faktor aktivitásegyesre, egy standard görbét elkészítve, melyhez a normál összegyűjtött humán plazmát (feltételezve, hogy milliliterenként 1 egység VII faktor aktivitással rendelkezik; elkészítve egészséges donoroktól származó citráttal kezelt szérum összegyűjtésével) használjuk, amit 1:5 aránytól 1:640 arányig hígítunk. Ezt a vizsgálati módszert használva, a módosított VII faktor preparátumai nem rendelkeznek kimutatható koagulációs aktivitással. A II. táblázatban összefoglaltuk az eredményeket, feltüntetve az alvadási időket, melyeket a kontroll (nem transzformált) BHK-sejtek közegénél (K-vitaminnal vagy a nélkül), a vad típusú VII faktornál és a módosított VII faktort expresszáló sejtek két izolátumánál mértünk. A VII faktor aktivitása abban mutatkozik meg, hogy esetében az alvadási idő csökken a kontrollmintákhoz viszonyítva.

II. táblázat

Minta	Hígítás	Alvadási idő (s)
Kontroll, K-vitaminnal	1:5	33,1
Kontroll, K-vitamin nélkül	1:10	33,4
	1:5	34,3
	1:10	33,2

II. táblázat (folytatás)

Minta	Hígítás	Alvadási idő (s)
Vad típusú VII faktor	1:20	19,0
	1:40	21,5
	1:80	23,3
Módosított VII faktor (# 6)	1:1	33,5
Módosított VII faktor (# 10)	1:1	32,5

Hogy meghatározzuk a módosított VII faktorok a plazma faktorokra gyakorolt hatását, a módosított VII faktor és a rekombináns vad típusú VII faktor vagy a természetes VII faktor preparátumát X vagy IX faktoral inkubáljuk, és az alvadási vizsgálati eljárásokkal vagy poliakrilamidgélelektroforézissel meghatározzuk az aktivitásukat.

3. példa

A módosított VII faktor szöveti faktorhoz kötődő képessége

A módosított VII faktornak a vad típusú VII faktoral szembeni versenyképességét a szöveti faktorért, valamint az alvadást gátló aktivitását egy lépéses alvadásvizsgálattal mérjük meghatározott mennyiségű szöveti faktor (tromboplasztin) jelenlétében.

Az alvadási időt egy egy lépéses eljárással határozzuk meg, hasonlóan a 2. példában leírtakhoz. A kísérleti elegy meghatározott mennyiségű szöveti faktort, állandó mennyiségű vad típusú VII faktort és növekvő mennyiségű

gű módosított VII faktort tartalmaz. A VII/VIIa faktor prokoaguláns aktivitásának gátlását a növekvő mennyiségű VII faktor variánst tartalmazó elegy megnövekedett alvadási ideje jelzi.

- 5 A vizsgálati mintában lévő VII faktor aktivitását százalékosan adjuk meg egy standard görbéhez viszonyítva, ami a VII faktor aktivitását mutatja normál összegyűjtött plazmában. A standard görbe felvételéhez foszfátpufferoldatban (PBS) elkészítjük a normál összegyűjtött plazma hígítási sorozatát 1:5 hígítási aránytól kezdve 1:640 hígítási arányig. Feltételezzük, hogy a normál plazma milliliterenként körülbelül 5 ng VII faktort tartalmaz, és ezt tekintjük az aktivitás egy egységének. Az elegy 100 µl VII faktor hiányos plazmát, 100 µl hígított plazmát és 200 µl tromboplasztin-C-t (Dade, Miami, FL, USA) tartalmaz, az alvadási idő mérésére MLA Electra 800 automata műszer szolgál. A standard görbe elkészítéséhez az eredményeket grafikusán ábrázoljuk a százalékos aktivitásoknál (1:5 hígítást tekintjük 100%-os aktivitásnak) másodpercben megadva az alvadási időt.

- 20 A vizsgálati eljárás megköveteli, hogy a vad típusú VII faktort és a VII faktor variánst tartalmazó közegben a szérum 1%-nál kisebb mennyiségben legyen jelen. A PBS-ben történő hígítást úgy készítjük el, hogy az alvadási idő a standard görbére essen. A minimális hígítási arány általában 1:2. A végső térfogat 100 µl. A kísérletekben két különböző humán Ser₃₄₄ → Ala₃₄₄ VII faktor variánst vizsgáltunk („#10” és „#6”). Az eredményeket a III. táblázatban foglaltuk össze, melynek adatai mutatják: ahogy nő a VII faktor variáns mennyisége, úgy csökken a VIIa faktor százalékos aktivitása.

III. táblázat

Ser₃₄₄ → Ala variánssal kapott eredmények
[100%-nak tekintjük a 10 µl B4A1 (vad típus) közeggel kapott aktivitást]

Ser ₃₄₄ → Ala klón száma	A variáns közegének mennyisége	A B4A1 közegének mennyisége	BHK kontroll*	VIIa faktor százalékos aktivitása
#10	10 µl	10 µl	0	70
#10	20 µl	10 µl	0	51
#10	30 µl	10 µl	0	43
#10	40 µl	10 µl	0	34
#10	50 µl	10 µl	0	28
#10 (-K)**	20 µl	10 µl	0	78
#6	10 µl	10 µl	0	74
#6	20 µl	10 µl	0	56
#6	30 µl	10 µl	0	46
#6	40 µl	10 µl	0	41
#6	50 µl	10 µl	0	32
#6 (-K)	20 µl	10 µl	0	85
BHK kontroll	0	10 µl	20 µl	91
BHK kontroll (-K)	0	10 µl	20 µl	107

* nem transzfektált BHK- (baby hamster kidney) sejtek közege

** a VII faktor variánsok expresszálsához a sejteket K-vitamint tartalmazó közegben tenyésztjük, ahol a K-vitamint elhagytuk, a táblázatban „-K”-val jelöljük.

A kísérletek azt bizonyítják, hogy a VII faktor Ser₃₄₄ → Ala variánsa dóziszfüggő módon verseng a természetes VII faktorttal, és gátolja a natív VII/VIIa faktor prokoaguláns aktivitását. Levonható tehát a következtetés, hogy a humán VII faktor Ser₃₄₄ → Ala variánsa verseng a natív humán VIIa faktorttal, következésképpen gátolja a humán plazmában lévő X és/vagy IX faktor aktiválását.

4. példa

A VII faktor reakciója PPACK-kal

A rekombináns VII faktort transzfektált BHK- (baby hamster kidney) sejtekben készítjük el. A fehérje tisztításához és aktiválásához a módszert leírják Thim és munkatársai [Biochemistry 27: 7785–7793 (1989)], Brinkous és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1382–1386 (1989)], Bjoern és Thim [Res. Discl. No. 269, 564 (1986)] (az említett cikkek referenciaként beépítve). A sejt kultúra közegét szűrjük, csökkentett sókoncentrációban hígítjuk. A hígított közeget anioncserélő kromatográfiával frakcióra bontjuk, eluensként puffert kalcium-klorid-oldatot használva. A VII faktort tartalmazó frakciókat tovább tisztítjuk immunokromatográfiával kalciumfüggő anti-VII faktor monoklonális antitestet használva. További tisztítást végzünk két anioncserélő kromatografálással, ahol a VII faktort kalcium-klorid-, illetve nátrium-klorid-oldattal eluáljuk. A végső eluátumban nyerjük a VIIa faktort.

1 µM rekombináns VIIa faktort inkubálunk 5, 20 és 60 percen át 20 µM PPACK-kal (D-fenil-alanil-prolil-arginil-klór-metil-ke-ton; Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Annyi kromogén S2288 szubsztátot (H-D-izoleucin-L-prolil-L-arginin-p-nitro-anilid; Kabi Vitrum AB, Molndal, Svédország) tartalmazó puffert adunk a reakcióelegyhez, hogy körülbelül 2,5-szeres hígítást és 0,3 mM S2288 végkoncentrációt érjünk el. Mérjük a keletkezett p-nitro-anilint, és a kapott értékeket a kontrollként használt kezeletlen VIIa faktorttal kapott értékhez viszonyítjuk. Az eredmények azt mutatják, hogy az adott reakció körülmények között a VIIa faktor 60 perc alatt teljesen inaktiválódik.

5. példa

DEGR VIIa faktor előállítás

A 4. példában leírtak szerint rekombináns VIIa faktort készítünk. A rekombináns VIIa faktor 10 mM glicin-pufferben (pH=8,0) – mely tartalmaz 10 mM kalcium-kloridot és 50 mM nátrium-kloridot – készült oldatát meghígítjuk, hogy a koncentrációja 1,5 mg/ml legyen. Desztillált vízben oldva, tízszeres moláris feleslegben denzil-L-Glu-Gly-Arg-klór-metil-ke-ton (DEGRck; Calbiochem, La Jolla, CA 92037, USA) adunk a VIIa faktorthoz. Kétórás, 37 °C hőmérsékleten történő inkubálás után további DEGRck-t adunk az oldathoz szintén tízszeres moláris feleslegben, és további 2 órán át inkubálunk 37 °C hőmérsékleten. A VIIa faktorthoz egy harmadik, tízszeres feleslegben lévő DEGREck adagot is adunk, és 4 °C hőmérsékleten inkubálunk 16 órán át. A DEGR–VIIa faktor oldatát kimerítően dializáljuk 4 °C hőmérsékleten Tris-pufferes sóoldattal szemben

(0,05 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH=7,5), hogy eltávolítsuk a szabad DEGRck-t.

A végső DEGR–VIIa faktor mintát szabad DEGRck-ra megvizsgáljuk Xa faktor kromogén szubsztátos vizsgálattal. A DEGR–VIIa faktor oldatot hozzáadjuk a tisztított humán Xa faktorthoz, mely mellett kromogén S–2222 szubsztát is van. Ezt a szubsztátot specifikusan hasítja a Xa faktor, de nem hasítja a VIIa faktor. Az elegyben lévő kötetlen DEGRck képes a Xa faktorthoz kötődni, és ezáltal gátolja a Xa faktor kromogén aktivitását. Szabad DEGRck-t adva a Xa faktor oldatához, elkészíthetünk egy standard görbét, mellyel a Xa faktor kromogén aktivitásának gátlása alapján meghatározhatjuk az oldatban lévő szabad DEGRck mennyiségét. A DEGR–VIIa faktor oldatának analízise azt mutatja, hogy a szabad DEGRck/DEGR–VIIa faktor arány a kimerítő dialízis után kevesebb, mint 0,5%, ami bizonyítja, hogy az alábbiakban leírt különböző vizsgálati rendszerekben a DEGR–VIIa faktor okozta gátlás nem a szabad DEGRck jelenlétének következménye.

6. példa

Xa faktor előállítása patkány-simaizomsejtekkel

Vaszkuláris simaizomsejteket megvizsgálunk abból a szempontból, hogy felszínükön van-e szöveti faktor. Ehhez mérjük a sejtek X faktort aktiváló képességét, olyan kromogén szubsztátot felhasználva, melyre specifikus a Xa faktor.

Patkányvérér simaizomsejtjeit [Clowes és munkatársai, J. Clin. Invest., 93: 644–651 (1994)] 8000 sejt/luk koncentrációban 96 lukú (American Scientific Products, Chicago, IL, USA) lemezekre visszük. A növesztő tápközeg összetétele:

IV. táblázat

500 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco–BRL, Gaithersburg, MD) 10% fetális borjuszérum (Hyclone, Logan, UT) 1 mM nátrium-piruvát (Irvine, Santa Ana, CA) 0,29 mg/ml L-glutamin (Hazelton, Lenexa, KS) 1 × PSN (100 × PSN-ben: 5 mg/ml penicillin, 5 mg/ml sztreptomycin, 10 mg/ml neomicin) (Gibco–BRL, Gaithersburg, MD).
--

48 órás, 37 °C hőmérsékleten történő inkubálás után a közeget szérumentes közegre cseréljük, melynek összetétele:

V. táblázat

250 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 250 ml Ham's F–12 Medium (Fred Hutchinson Cancer Reserch Center, Seattle, WA) 1 mM nátrium-piruvát 0,29 mg/ml L-glutamin 20 mM transferrin (JRH, Lenexa, KS) 5 µM inzulin (Gibco–BRL) 16 ng szelén (Aldrich, Milwaukee, WI) 1 mg/ml szarvasmarha-szérumbalbumin (Sigma, St. Louis, MO).

A sejteket 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk 72 órán keresztül. Az inkubáció után vagy PDGF–BB növekedési faktort (10 ng/ml; platelet-derived growth factor, homológ B láncokkal) vagy 10% fetális borjúsérumot adunk a sejtekhez, hogy fokozzuk a szöveti faktor expresszáldását [Taubman és munkatársai, J. Clin. Invest., 91: 547–552 (1993)]. Olyan párhuzamos sejtenyészetet is készítünk, mely nem kap sem növekedési faktort, sem sérumot, hogy azon ellenőrizzük a nem stimulált sejtek intrinszik aktivitását. Hatórás inkubáció után rekombináns humán VIIa faktort adunk a sejtekhez 10 nM végkoncentrációban. A sejtenyészetek egy része nem kap VIIa faktort, ezek a negatív kontrollok. A sejteket 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk 2 órán át, majd HEPES-pufferral mossuk (10 mM HEPES, 137 mM nátrium-klorid, 4 mM kálium-klorid, 5 mM kalcium-klorid, 11 mM glükóz, 0,1% BSA). Mosás után a sejteket 5 percig inkubáljuk lukanként 50 µl 200 nM plazmatisztított humán X faktor oldatban, melyet 5 mM kalcium-kloridot tartalmazó Tris-pufferes sóoldatban készítünk el. Az egyes lukakhoz hozzáadunk 25 µl 0,5 M EDTA-oldatot és 25 µl 800 µM S–2222 kromogén szubsztátoldatot (Kabi Pharmacia, Franklin, OH). A lemezeket szobahőmérsékleten inkubáljuk 40 percen át, majd 405 nm-en mérjük THERMO MAX Microplate Reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA) készülékkel.

A VII. táblázat adatai mutatják, hogy a VIIa faktoral kezelte lukak abszorbanciája megnő a kontrollhoz (nem kaptak VIIa faktort) viszonyítva. Az abszorbancia megnövekedése közvetlen mértéke a lukakban termelődött Xa faktor mennyiségének és az azt követő, a kromofort felszabadító szubsztátasításnak. Az adatok azt is bizonyítják, hogy a növekedési faktoral (PDGF–BB) vagy a 10%-os fetális borjúsérummal (FCS) előkezelt sejtek kromogén aktivitása magasabb, mint a stimulálatlan sejteké.

VI. táblázat

Vizsgálati minta	OD ₄₀₅
Kontroll	0,043
Intrinszik aktivitás	0,247
PDGF–BB	0,360
10% FCS	0,342

Ezek az adatok világosan bizonyítják, hogy a patkányvérér simaizomsejtjeinek a felületén a X faktor Xa faktoral aktiválódik a VIIa faktoral hatására.

7. példa

Sejtfelületi kromogén aktivitás gátlása DEGR–VIIa faktoral

A fentiekben leírt módon patkányvérér-simaizomsejteket telepítünk a 96 lukú lemezre. A sejteket sérumentes közegben tenyésztjük 72 órán át a fentiekben leírtak szerint, majd 10% fetális borjúsérum hozzáadásával 6 órán át stimuláljuk a szöveti faktor expresszáldását. A stimuláció után csak puffert (kontroll) vagy

10 nM VIIa faktort vagy 10 nM VIIa faktort+100 nM DEGR–VIIa faktort adunk az egyes lukakba. A sejteket 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk 2 órán át, majd HEPES-pufferral mossuk. Mosás után a sejteket 5 percen át 50 µl 200 nM X faktor oldatban inkubáljuk, amit 5 mM kalcium-kloridot tartalmazó Tris-pufferes sóoldatban készítünk el. Minden lukhoz hozzáadunk 25 µl 0,5 M EDTA-oldatot és 25 µl kromogén S–2222 szubsztátoldatot (800 µM) (Kabi Pharmacia). A sejteket 40 percen át inkubáljuk szobahőmérsékleten. A kromogén aktivitást 405 nm-en mérjük a fentiekben ismertetett módon.

A VII. táblázat adatai mutatják, hogy csak a VIIa faktoral kezelte sejteknél történt meg a kromogén aktivitás stimulációja, és a stimulációt gátolta, ha a VIIa faktoral egy időben DEGR–VIIa faktoral is inkubáltuk a sejteket. Az eredmények bizonyítják, hogy a DEGR–VIIa faktor kompetitív antagonistaként működik a VIIa faktor megkötődésénél, ezáltal gátolja a X faktor aktiválódását és azt követően az S–2222 kromogén szubsztát hasítását.

VII. táblázat

Vizsgálati minta	OD ₄₀₅
Kontroll	0,035
VIIa faktor	0,342
VIIa faktor+DEGR–VIIa faktor	0,072

8. példa

Sejtfelületi kromogén aktivitás dózisfüggő gátlása DEGR–VIIa faktoral patkány simaizomsejtjén vizsgálva

A patkányvérér simaizomsejtjeiből lukanként 4000 sejtet telepítünk a 96 lukú tenyésztőlemezre. A növesztő tápközeget kiegészítjük 1% fetális borjúsérummal (mint a IV. táblázatban, de ott 10% sérum van a közegben). 5 nap után a közegeltávolítjuk, és növekvő koncentrációjú VIIa faktor oldatot, illetve 10 nM VIIa faktor mellett növekvő koncentrációban DEGR–VIIa faktort adunk a sejtekhez. Két órán át inkubálunk 37 °C hőmérsékleten, majd a sejteket mossuk, és 5 percen át szobahőmérsékleten inkubáljuk 50 µl 200 nM X faktor oldatban, amit Tris-pufferben készítünk el. Mindegyik lukhoz hozzáadunk 25 µl 0,5 M EDTA-oldatot és 25 µl 800 µM S–2222 szubsztátot (Kabi Pharmacia), majd a lemezeket szobahőmérsékleten inkubáljuk 40 percen át. A kromogén aktivitást 405 nm-en mérjük a fentiekben ismertetett készüléken.

A VIII. táblázat eredményei mutatják azt a dózisfüggő kromogén aktivitásnövekedést, ami a lukakhoz adott VIIa faktor növekvő mennyiségével elérhető. Ha a 100 nM VIIa faktoral együtt DEGR–VIIa faktort is adunk a sejtekhez, megfigyelhető a kromogén aktivitás dózisfüggő gátlása (IX. táblázat). Ha a DEGR–VIIa faktor/VIIa faktor molaránya 1:1, a kromogén aktivitás gátlása körülbelül 95%-os. Ezek az adatok arra valtanak, hogy a DEGR–VIIa faktoral lényegesen magasabb affinitása van a sejtfelületi szöveti faktoralhoz, mint a natív VIIa faktoralnak. Ha a DEGR–VIIa faktoralnak és

a VIIa faktornak azonos affinitása lenne, akkor abban az esetben, ha a két molekulát azonos molarányban adjuk a sejtekhez, a tapasztalt gátlási szint nem lehetne ilyen magas.

VIII. táblázat

VIIa faktor koncentráció	OD ₄₀₅
0,10	0,005
0,39	0,025
1,56	0,058
6,25	0,111
25,00	0,154
100,00	0,208

A IX. táblázat a Xa faktor kromogén aktivitásának dóziszfüggő gátlását mutatja be DEGR-VIIa faktorról patkány simaizomsejtjein. 100 nM VIIa faktor mellett a sejteket növekvő koncentrációjú DEGR-VIIa faktorral együtt inkubáljuk, és a Xa faktor kromogén aktivitását S-2222 kromogén szubsztrátot használva határozzuk meg.

IX. táblázat

DEGR-VIIa faktor koncentrációja (nM)	OD ₄₀₅
0,00	0,208
0,39	0,176
1,56	0,116
6,25	0,073
25,00	0,026
100,00	0,024

9. példa

A Xa faktor keletkezésének gátlása DEGR-VIIa faktorról

A X faktor tisztított, rekombináns, oldható szöveti faktorról történő Xa faktorrá való átalakítását kromogén módszerrel vizsgáljuk. A szöveti faktor expresszá-lása és tisztítása *Saccharomyces cerevisiae*-ből történik [Shigematsu és munkatársai, J. Biol. Chem., 267; 21 329–21 337 (1992)]. Az oldható szöveti faktor tisztítását és jellemzését Dr. Walt Kisiel végezte (University of New Mexico, Albuquerque, NM). A reakcióelegy összetétele: 6,5 µl oldható szöveti faktor (2,2 µM), 29,0 PCPS (1 mM, Sigma, St. Louis, MO), 29,5 µl hu-mán X faktor (4,1 µM), 2,77 ml Hank-puffer (25 mM Tris, pH=7,4, 150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 0,1% BSA). A 96 lukú lemez minden egyes lukába bemérünk 40 µl szöveti faktor/X faktor ele-gyet, 25 µl TBS-sel (20 mM Tris, pH=7,4, 150 mM NaCl) hígított VIIa faktort és 25 µl TBS-sel hígított DEGR-VIIa faktort. A kontroll 40 µl szöveti faktor/X faktor elegyet, 25 µl TBS-sel hígított VIIa faktort és 25 µl csak TBS-t tartalmaz. A lukakban lévő reak-

cióelegyhez hozzáadunk 10 µl S-2222 (4 mM) kromogén szubsztrátot, és szobahőmérsékleten inkubálunk 2–10 percen keresztül. A mérést 405 nm-en végezzük a fent ismertetett készülékkel.

A X faktor VIIa faktorról történő aktiválásának standard görbét úgy állapítjuk meg, hogy a VIIa faktort növekvő koncentrációban adjuk a DEGR-VIIa faktort nem tartalmazó reakcióelegyhez. A X. táblázatban összefoglalt eredmények azt mutatják, hogy a kromogén aktivitás dóziszfüggően növekszik, amint egyre nagyobb mennyiségű VIIa faktort adunk a reakcióelegy-hez. 100 nM VIIa faktort tartalmazó elegyhez növekvő mennyiségű DEGR-VIIa faktort adva, a kromogén aktivitás dóziszfüggően csökken (XI. táblázat). Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a DEGR-VIIa faktor kompetitív antagonistaként működik a natív VIIa faktor oldható szöveti faktorhoz való kötődésénél, és ezáltal gátolja a Xa faktor keletkezését, amit a kromogén S-2222 szubsztráttal szembeni csökkenő aktivitás alapján mérhetünk.

X. táblázat

A Xa faktor kromogén aktivitásának fokozása a VIIa faktor növekvő koncentrációban történő hozzáadá-sával. Az optikai sűrűség (OD₄₀₅) változását mérjük kromogén S-2222 szubsztrát alkalmazásával

VIIa faktor koncentrációja (nM)	OD ₄₀₅
0,78	0,168
1,156	0,288
3,12	0,478
6,25	0,694
12,50	0,764
25,00	0,790
50,00	0,738
100,00	0,770

XI. táblázat

A Xa faktor kromogén aktivitásának gátlása DEGR-VIIa faktorról. A DEGR-VIIa faktort az oldha-tó szöveti faktorhoz adjuk hozzá natív VIIa faktor jelen-létében. Az optikai sűrűség (OD₄₀₅) változását mérjük a kromogén S-2222 szubsztrát alkalmazásával

DEGR-VIIa faktor koncentrációja (nM)	OD ₄₀₅
0	0,810
50	0,750
100	0,609
200	0,296
400	0,167
800	0,083
1600	0,055

10. példa

A koaguláció gátlása DEGR-VIIa faktoral

A DEGR-VIIa faktor alvadási időre gyakorolt hatásának standard vizsgálati eljárása a következő: a nátrium-citráttal, mint olvadásgátlóval összegyűjtött normál páviánplazma 100 µl-ét hozzáadjuk a TBS-ben (20 mM Tris, pH=7,4, 150 mM nátrium-klorid) hígított DEGR-VIIa faktor változó koncentrációjú oldatához. A mintákat összekeverjük, és rövid ideig inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten. A mintákat Electra 800 Automatic Coagulation Timer (Medicial Laboratories Automation, Pleasantville, NY.) készülékbe visszük. Inkubálás után 200 µl 25 mM kalcium-kloridot tartalmazó szövetifaktor-preparátumot adunk a DEGR-VIIa faktor oldathoz. A szöveti faktor preparátumát frissen lefagyasztott páviánagyból készítjük az agyszövetet sóoldattal extrahálva, és a preparátum koagulációképességét páviánplazmában megállapítva. Olyan koncentrációjú szövetifaktor-preparátumot használunk fel, mely 40 másodperc körüli alvadási időt eredményez.

A XII. táblázat bizonyítja, hogy a DEGR-VIIa faktor hozzáadásával dózisfüggően hosszabbodik az alvadási idő. A plazmában 1 µg/ml DEGR-VIIa faktor dózis már szignifikánsan növeli az alvadási időt.

XII. táblázat

Az alvadási idő dózisfüggő növekedése DEGR-VIIa faktor hatására

DEGR-VIIa faktor (µg/ml plazma)	Alvadási idő (mp)
0	40,7
0,5	46,2
1,0	50,8
2,5	64,5
5,0	108,1
10,0	158,4

11. példa

A vérlemezek felgyűlésének gátlása DEGR-VIIa faktoral

A DEGR-VIIa faktor azon képességét, hogy gátolja a vérlemezek felgyűlését az artériatrombózis helyén, főemlősök mechanikusan felsértett artériáján vizsgáljuk. Az aortaendarterektómia modellezéséhez páviánokat használunk, lényegében ahogyan azt Lumsden és munkatársai leírták [Blood, 81: 1762-1770 (1993)]. Eltávolítunk egy 1-2 cm hosszú aortaszakaszt, kifordítjuk és kaparással eltávolítjuk az artéria-belhártyát és a tunica medica 50%-át. Az artériát visszafordítjuk az eredeti helyzetébe, mindkét végén kanült helyezünk el, és beépítjük az állat testen kívül kialakított söntjébe, ezáltal a mechanikusan felsértett artériát a söntön keresztül az állat véráramának tesszük ki. Mielőtt megnyitnánk a söntöt a vérkeringés előtt ¹¹In-jelölt antológ vérlemezeket injektálunk intravénásan az állatba. A felsértett artéria helyén történő vérlemez felgyűlését valós idős gamma-kamera-leképzéssel határozzuk meg.

A DEGR-VIIa faktor vérlemezek felgyűlését gátló hatásának mérésére DEGR-VIIa bóluszt vagy a kontrollnál sóoldatot injektálunk közvetlenül a sönt megnyitása előtt. A felsértett artériákat 60 percen át folyamatosan mérjük. 0,005 mg/testsúlykilogramm DEGR-VIIa faktor dózisa gátolja a vérlemezek felgyűlését. 1,0 mg/kg bólusz injektálásnál a vérlemezek felgyűlésének gátlása 90% körüli egy órával a hatóanyag beadása után.

Ezek az adatok azt mutatják, hogy a DEGR-VIIa faktoral történő szövetifaktor-gátlással szignifikánsan megakadályozható a főként vérlemezéből álló trombuszok kialakulása főemlősök akut vérérsérülés-modellje esetében.

A fent elmondottak alapján megállapítható, hogy a katalitikus helyeken módosított VII faktor vagy a módosított VII faktor készítmények képesek hozzákötődni a szöveti faktorhoz, de lényegében képtelenek a X és IX faktorokat aktiválni. Minthogy a módosított VII faktor specifikusan szakítja meg a koagulációs kaszkádot anélkül, hogy csökkentené és felhasználná az alvadási faktorokat, várható, hogy a módosított VII faktor készítményeinek alkalmazásával kevesebb nemkívánatos mellékhatás fog megjelenni, mint a jelenleg használatos terápiáknál. Továbbá az itt leírt módosított VII faktor könnyen előállítható rekombináns technikával. Ezek szerint a hatékonyság, a megfelelőség és kisebb dózisok gazdaságossága továbbá a ritkább beadás és a toxicitás viszonylagos hiánya előnyöket biztosít a jelen táblázat szerinti készítmények számára.

Noha a jobb megértés céljából az elmondottakat illesztjük példákkal és példákkal részletezve adtuk közre, nyilvánvaló, hogy bizonyos változtatások és módosítások még elvégezhetőek a mellékelt igénypontok oltalmi körén belül.

SZEKVENCIALISTA

- (1) Általános információk
 - (i) Szabadalmaztató
 - (A) Név: ZymoGenetics, Inc. et al.
 - (B) Utca: 4225 Roosevelt Way N. E.
 - (C) Város: Seattle
 - (D) Állam: Washington
 - (E) Ország: Amerikai Egyesült Államok
 - (F) Postai kódszám: 98105
 - (G) Telefon: (206)547-8080
 - (H) Telefax:
 - (I): Telex:
 - (ii) A találmány címe: Módosított VII faktor
 - (iii) Szekvenciák száma: 4
 - (iv) A komputer olvasható formátuma
 - (A) A közvetítőeszköz típusa: floppylemez
 - (B) Komputer: IBM PC kompatibilis
 - (C) Operációs rendszer: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) Software: Patent In Release # 1,0, Version # 1,25
 - (v) Jelenlegi bejelentési adatok:
 - (A) A bejelentés száma:
 - (B) A benyújtás időpontja: 1994. május 23.
 - (C) Osztályozás:
 - (vi) Előző bejelentési adatok:
 - (A) A bejelentés száma: US 08/065,725
 - (B) A benyújtás időpontja: 1993. május 21.

- (vi) Előző bejelentési adatok:
 (A) A bejelentés száma: US 07/662,920
 (B) A benyújtás időpontja: 1991. február 28.
- (vii) A meghatalmazott adatai:
 (A) Név: Parmelec, Steven W. 5
 (B) Regisztrációs száma: 31990
 (C) Referencia/listaszám: 13952-8-1PC
- (viii) A telekommunikációs adatok:
 (A) Telefon: 206-467-9600
 (B) Telefax: 415-543-5043 10
- (2) Az ID NO: 1 szekvencia adatai:
 (i) A szekvencia tulajdonságai:
 (A) Hossza: 2422 bázispár
- (B) Típusa: nukleinsav
 (C) Száلتípusa: egyszálú
 (D) Topológiája: lineáris
 (ii) A molekula típusa: cDNS
 (iii) Feltételezés: N
 (iv) Antiszenzitás: N
 (ix) Tulajdonságok
 (A) Név/kulcs: CDS
 (B) Lokáció: 28...1420
 (D) Egyéb információk: /kód start:=28 /termék=„VII faktor”
 (xi) A szekvencia leírása: SEQ ID NO: 1:

CCTCCCGACA ATACAGGGGC AGCACTGCAG AGATTTCATC ATG GTC TCC CAG GCC 55
 Met Val Ser Gln Ala
 -38 -35

CTC AGG CTC CTC TGC CTT CTG CTT GGG CTT CAG GGC TGC CTG GCT GCA 103
 Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln Gly Cys Leu Ala Ala
 -30 -25 -20

GTC TTC GTA ACC CAG GAG GAA GCC CAC GGC GTC CTG CAC CGG CGC CGG 151
 Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg
 -15 -10 -5

CGC GCC AAC GCG TTC CTG GAG GAG CTG CGG CCG GGC TCC CTG GAG AGG 199
 Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg
 1 5 10 15

GAG TGC AAG GAG GAG CAG TGC TCC TTC GAG GAG GCC CGG GAG ATC TTC 247
 Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe
 20 25 30

AAG GAC GCG GAG AGG ACG AAG CTG TTC TGG ATT TCT TAC AGT GAT GGG 295
 Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly
 35 40 45

GAC CAG TGT GCC TCA AGT CCA TGC CAG AAT GGG GGC TCC TGC AAG GAC 343
 Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
 50 55 60

CAG CTC CAG TCC TAT ATC TGC TTC TGC CTC CCT GCC TTC GAG GGC CGG 391
 Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg
 65 70 75

AAC TGT GAG ACG CAC AAG GAT GAC CAG CTG ATC TGT GTG AAC GAG AAC 439
 Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn
 80 85 90 95

GGC GGC TGT GAG CAG TAC TGC AGT GAC CAC ACG GGC ACC AAG CGC TCC 487
 Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser
 100 105 110

TGT CGG TGC CAC GAG GGG TAC TCT CTG CTG GCA GAC GGG GTG TCC TGC 535
 Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys
 115 120 125

ACA CCC ACA GTT GAA TAT CCA TGT GGA AAA ATA CCT ATT CTA GAA AAA 583
 Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys
 130 135 140

AGA AAT GCC AGC AAA CCC CAA GGC CGA ATT GTG GGG GGC AAG GTG TGC 631
 Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys
 145 150 155

CCC AAA GGG GAG TGT CCA TGG CAG GTC CTG TTG TTG GTG AAT GGA GCT	679
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala	
160 165 170 175	
CAG TTG TGT GGG GGG ACC CTG ATC AAC ACC ATC TGG GTG GTC TCC GCG	727
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala	
180 185 190	
GCC CAC TGT TTC GAC AAA ATC AAG AAC TGG AGG AAC CTG ATC GCG GTG	775
Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val	
195 200 205	
CTG GGC GAG CAC GAC CTC AGC GAG CAC GAC GGG GAT GAG CAG AGC CGG	823
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg	
210 215 220	
CGG GTG GCG CAG GTC ATC ATC CCC AGC ACG TAC GTC CCG GGC ACC ACC	871
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr	
225 230 235	
AAC CAC GAC ATC GCG CTG CTC CGC CTG CAC CAG CCC GTG GTC CTC ACT	919
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr	
240 245 250 255	
GAC CAT GTG GTG CCC CTC TGC CTG CCC GAA CGG ACG TTC TCT GAG AGG	967
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg	
260 265 270	
ACG CTG GCC TTC GTG CGC TTC TCA TTG GTC AGC GGC TGG GGC CAG CTG	1015
Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu	
275 280 285	
CTG GAC CGT GGC GCC ACG GCC CTG GAG CTC ATG GTC CTC AAC GTG CCC	1063
Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro	
290 295 300	
CGG CTG ATG ACC CAG GAC TGC CTG CAG CAG TCA CGG AAG GTG GGA GAC	1111
Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp	
305 310 315	
TCC CCA AAT ATC ACG GAG TAC ATG TTC TGT GCC GGC TAC TCG GAT GGC	1159
Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly	
320 325 330 335	
AGC AAG GAC TCC TGC AAG GGG GAC AGT GGA GGC CCA CAT GCC ACC CAC	1207
Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His	
340 345 350	
TAC CGG GGC ACG TGG TAC CTG ACG GGC ATC GTC AGC TGG GGC CAG GGC	1255
Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly	
355 360 365	
TGC GCA ACC GTG GGC CAC TTT GGG GTG TAC ACC AGG GTC TCC CAG TAC	1303
Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr	
370 375 380	
ATC GAG TGG CTG CAA AAG CTC ATG CGC TCA GAG CCA CGC CCA GGA GTC	1351
Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val	
385 390 395	
CTC CTG CGA GCC CCA TTT CCC TAG C CCAGCAGCCC TGGCCTGTGG	1396
Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro	
400 405	
AGAGAAAGCC AAGGCTGCGT CGAACTGTCC TGGCACCAAA TCCCATATAT TCTTCTGCAG	1456
TTAATGGGGT AGAGGAGGGC ATGGGAGGGA GGGAGAGGTG GGGAGGGAGA CAGAGACAGA	1516
AACAGAGAGA GACAGAGACA GAGAGAGACT GAGGGAGAGA CTCTGAGGAC ATGGAGAGAG	1576

ACTCAAAGAG ACTCCAAGAT TCAAAGAGAC TAATAGAGAC ACAGAGATGG AATAGAAAAG 1636
 ATGAGAGGCA GAGGCAGACA GGCGCTGGAC AGAGGGGCGAG GGGAGTGCCA AGGTTGTCCT 1696
 GGAGGCAGAC AGCCCAGCTG AGCCTCCTTA CCTCCCTTCA GCCAAGCCCC ACCTGCACGT 1756
 GATCTGCTGG CCCTCAGGCT GCTGCTCTGC CTTCAATTGCT GGAGACAGTA GAGGCATGAA 1816
 CACACATGGA TGCACACACA CACACGCCAA TGCACACACA CAGAGATATG CACACACACG 1876
 GATGCACACA CAGATGGTCA CACAGAGATA CGCAAACACA CCGATGCACA CGCACATAGA 1936
 GATATGCACA CACAGATGCA CACACAGATA TACACATGGA TGCACGCACA TGCCAATGCA 1996
 CGCACACATC AGTGCACACG GATGCACAGA GATATGCACA CACCGATGTG CGCACACACA 2056
 GATATGCACA CACATGGATG AGCACACACA CACCAAGTGC GCACACACAC CGATGTACAC 2116
 ACACAGATGC ACACACAGAT GCACACACAC CGATGCTGAC TCCATGTGTG CTGTCCTCTG 2176
 AAGGCGGTTG TTTAGCTCTC ACTTTTCTGG TTCTTATCCA TTATCATCTT CACTTCAGAC 2236
 AATTCAGAAG CATCAACATG CATGGTGGCG AATGCCCCCA AACTCTCCCC CAAATGTATT 2296
 TCTCCCTTCG CTGGGTGCCG GGCTGCACAG ACTATTCCCC ACCTGCTTCC CAGCTTCACA 2356
 ATAAACGGCT GCGTCTCCTC CGCACACCTG TGGTGCCTGC CACCCAAAAA AAAAAAAAAA 2416
 AAAAAA 2422

(2) Az ID NO: 2 szekvencia adatai:

(i) A szekvencia tulajdonságai

(A) Hossza: 441 aminosav

(B) Típusa: aminosav

(D) Topológiája: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: SEQ ID NO: 2:

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Trp Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 -38 -35 -30 -25
 Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
 -20 -15 -10
 Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
 -5 1 5 10
 Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
 15 20 25
 Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
 30 35 40
 Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
 45 50 55
 Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
 60 65 70
 Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
 75 80 85 90
 Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
 95 100 105
 Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
 110 115 120

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
 125 130 135
 Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
 140 145 150
 Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
 155 160 165 170
 Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
 175 180 185
 Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
 190 195 200
 Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
 205 210 215
 Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
 220 225 230
 Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
 235 240 245 250
 Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
 255 260 265
 Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
 270 275 280
 Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
 285 290 295
 Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
 300 305 310
 Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
 315 320 325 330
 Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
 335 340 345
 Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
 350 355 360
 Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
 365 370 375
 Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
 380 385 390
 Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 395 400 405

(2) Az ID NO: 3 szekvencia adatai:

- (i) A szekvencia tulajdonságai
 - (A) Hossza: 21 bázispár
 - (B) Típusa: nukleinsav
 - (C) Száلتípusa: egyszálú
 - (D) Topológiája: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (iii) Feltételezés: N
- (iv) Antiszenzítás: N
- (xi) A szekvencia leírása: SEQ ID NO: 3:
TGGGCCTCCG GCGTCCCCT T 21

50 (2) Az ID NO: 4 szekvencia adatai:

- (i) A szekvencia tulajdonságai
 - (A) Hossza: 15 bázispár
 - (B) Típusa: nukleinsav
 - (C) Száلتípusa: egyszálú
 - (D) Topológiája: lineáris
- (ii) A molekula típusa: cDNS
- (iii) Feltételezés: N
- (iv) Antiszenzítás: N
- (xi) A szekvencia leírása: SEQ ID NO: 4:
TCCAGTCAC GACGT 15

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. A VII faktor X vagy IX plazmafaktorokat aktiváló képességét gátló legalább egy módosítással rendelkező VII faktor alkalmazása vérér újbóli beszűkülésének (resztenózis) gátlására alkalmas gyógyászati készítmény előállítására.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a módosítás abból áll, hogy egy szeril-proteáz-inhibitorral reagáltott VII faktort alkalmazunk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, ahol a proteáz-inhibitor egy szerves foszforvegyület, szulfonil-fluorid, peptid-halo-metil-ke-ton vagy egy azapeptid.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, ahol a proteáz-inhibitor az alábbi peptid-halo-metil-ke-tonok valamelyike: D-Phe-Pro-Arg-klór-metil-ke-ton vagy denzil-Glu-Gly-Arg-klór-metil-ke-ton.

5. A VII faktor X vagy IX plazmafaktorokat aktiváló képességét gátló legalább egy módosítással ren-

delkező VII faktor alkalmazása a vérlemezek felgyűlésének gátlására alkalmas gyógyászati készítmény előállítására.

5 6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, ahol a módosítás abból áll, hogy egy szeril-proteáz-inhibitorral reagáltott VII faktort alkalmazunk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, ahol a proteáz-inhibitor egy szerves foszforvegyület, szulfonil-fluorid, peptid-halo-metil-ke-ton vagy egy azapeptid.

10 8. A 7. igénypont szerinti eljárás, ahol a proteáz-inhibitor az alábbi peptid-halo-metil-ke-tonok valamelyike: D-Phe-Pro-Arg-klór-metil-ke-ton vagy denzil-Glu-Gly-Arg-klór-metil-ke-ton.

15 9. Az 5. igénypont szerinti eljárás, ahol a VII faktor módosítása abból áll, hogy legalább egy aminosavat kicserélünk, betoldunk vagy kiejtünk a Ser, Asp és His katalitikus triádban.

