

6124/89

1989/30

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

316/16
- 54208 -

GRÜNENTHAL GmbH, Aachen, Német Szövetségi Köztársaság

**ELJÁRÁS ÚJ SZERINPROTEÁZ-INHIBITOR-FEHÉRJÉK, AZ Ezeket Tartal-
MAZÓ GYÓGYÁSZATI KÉSZÍTMÉNYEK, A FENTI FEHÉRJÉKET KÓDOLÓ
DNS-SZEKVENCIÁK ÉS AZ E DNS-SZEKVENCIÁKAT TARTALMAZÓ EXPRESSZIÓS
VEKTOROK ELŐÁLLÍTÁSÁRA**

A bejelentés napja: 1989. 11. 22.

Elsősége: 1988. 12. 13. /P 38 41 873.8/

Német Szövetségi Köztársaság

KIVONAT

**A találmány tárgya biotechnológiai eljárás az /X/ ál-
talanos képletnek vagy legalább az 53-101 helyzetekben levő
szekvenciát magábanfoglaló részterületeinek megfelelő szer-
inproteáz-inhibitor-fehérjék /mely képletben W jelentése
tirozin vagy glutaminsav; X₁, X₂ és X₃ azonos vagy különböző
lehet és jelentésük metionin vagy leucin, azonban X₃ fenil-
alanint is képviselhet; Y jelentése prolin vagy arginin és
Z jelentése leucin vagy - amennyiben W tirozint és X₁, X₂ és
X₃ leucint képvisel - úgy Z isoleucin is lehet/ és a fenti
új szerinproteáz-inhibitor-fehérjék fűzés fehérjéinek elő-
állítására.**

**A fenti új fehérjék különösen humán leukocita-elasz-
tással szemben erős gátló hatást mutatnak és oxidatív lebom-
tással szemben kifejezetten stabilak.**

A találmány továbbá az új szarinproteáz-inhibitor-fehőrzéket kódoló új DNS-szekvenciák előállítására, a fenti fehérjéknek megfelelő gazdaszervezetekben különböző új vektorokkal történő kifejezésére, valamint az új fehérjék tisztta, biológiaiilag aktív formában történő előállítására vonatkozik.

Alu

6124/89

1990

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

A

54208-

Képviselő:

Budapesti 14. sz. Ügyvédi Munkaközösség

Dr.Tóth-Urbán László és Dr.Jalsovszky Györgyné ügyvédek

NSZOS:
C12N15/15
N61K37/64
C08H1/00

316/16

ELJÁRÁS UJ SZERINPROTEÁZ-INHIBITOR-FEHÉRJÉK, AZ EZEKET TARTALMAZÓ
GYÓGYÁSZATI KÉSZÍTMÉNYEK, A FENTI FEHÉRJÉKET KÓDOLÓ DNS-SZEKVENCIÁK
ÉS AZ E DNS-SZEKVENCIÁKAT TARTALMAZÓ EXPRESSZIÓS VEKTOROK ELŐ-
ÁLLÍTÁSÁRA

GRÜNENTHAL GmbH, Aachen, Német Szövetségi Köztársaság

Feltalálók:

Dr. HEINZEL-WIELAND Regina	Aachen,
Dr. ANMANN Joachim	Aachen,
Prof.Dr. STEFFENS Gerd Josef	Aachen,
Prof.Dr. FLOHÉ Leopold	Roetgen,

Német Szövetségi Köztársaság

A bejelentés napja: 1989. 11. 22.

Elsőbbsége: 1988. 12. 13. /P 38 41 873.8/

Német Szövetségi Köztársaság

Találmányunk tárgya új szerinproteáz-inhibitor-fehérjék előállítása, amelyek különösen emberi leukocitén-elasztázzal szemben kifejezett gátló hatással rendelkeznek, továbbá hasonló hatású természetes termékekkel ellentétben oxidatív inaktiválódással szemben ellenállóak és ennek következtében gyógyászati alkalmazásra az ismert termékekénél alkalmasabbak. Találmányunk szerint az új szerinproteáz-inhibitor-fehérjék rekombináns-DNS-módszerekkel készíthetők el. Találmányunk tárgya továbbá a fenti inhibitor-fehérjéket tartalmazó gyógyászati készítmények, a fenti új fehérjéket kódoló DNS-szekvenciák és a fenti DNS-szekvenciákat tartalmazó kifejező vektorok előállítása.

Az enzimek aktivitását élő sejtekben és szervezetekben elsősorban az enzimek újraszintetizálása és kémiai módosítása szabályozza. Ennek során a sejtek vagy szervezetnek bizonyos meghatározott enzim fokozott aktivitását igénylő, megváltozott helyzethez történő gyors alkalmazódása során az enzim fokozott újraszintetizálása nem minden esetben játszódik le, hanem gyakran látens enzinkészlet aktiválódik. A látens enzimek aktiválási mechanizmusaként specifikus peptidázok által előidézett lebontás, proteinkinázok jelenlétében lejátszódó foszforilozás, a vezikulumokból történő kirázás és a fehérje-konformációnak allosterikus ligandok által előidézett megváltoztatása ismert.

A fenti aktiválási reakciók túlzott mértékben történő lejátszódása és az aktivált enzimek^{túl} hosszú időn át kifejtett hatása az említett enzimek előzetes lebontásával vagy fajlagos gátlásával kerülhető el. Így pl. aktivált proteázok biológiai aktivitását specifikus proteáz-inhibitorok blokkolják.

As utóbbi években különböző proteáz-inhibitorok klinikai és patogén felhasználását ismerték fel. Így pl. endogén szerinproteázok az emésztőrendszerben lejátszó fehérjelebontásnál, az intracelluláris fehérjelebontásnál és -átalakításnál, a homeosztatikus egyensúly fenntartásánál, sérülések után a fertőzések elleni védekezésnél és szövetújraképződésnél jelentős fiziológiai szerepet játszanak. A szerinproteázok aktivitását legtöbb esetben különböző endogén inhibitorok állandóan vagy átmenetileg visszasserítják, ezáltal a biológiai szövetekre ható proteolitikus támadás azokra a speciális esetekre korlátozott, amelyekben a proteolitikus folyamatok meghatározott biológiai funkciókat töltenek be. Patológiai helyzetekben azonban a proteázok és inhibitoraik közötti egyensúly jelentős mértékben felberulhat. Fiziológiai szempontból túlzottan magas szerinproteáz-aktivitás az eredeti szövetkárosodást felerősítheti. Az ilyen helyzetek példaként az alábbi eseteket soroljuk fel: extrakorporális cirkuláció, antigén-antitest-reakciók vagy szeptikémia által bekövetkező szisztémás kiegészítő aktiválódás; intravasális véralvadás vagy extenzív fibrinolízis szeptikus sokkban; kötőszövetek lebomlása tumorinvasió, fertőzés, gyulladás és sokk esetében; a neu-testidegen fehérjék proteolitikus lebontása hasnyálmirigygyulladás esetében természetes környezetükből kilépő hasnyálmirigy-szerinproteázok által.

A szerinproteázok és szerinproteáz-inhibitorok megzavart egyensúlyával összefüggő klinikai betegségek az alábbi indikációkat foglalják magukban: véralvadászavarok, tumorek elburjánzó növekedése, emphysemia, arthritis, vesegyulladás

/pl. glomerulonephritis/ és különösen igen hevesen lejátékozódó gyulladások /pl. politraumatikus vagy szeptikus sokk esetében, amelyek légzőszervi-szindrómával együtt vagy anélkül, továbbá pankreatitis esetében játszódhatnak le/.

A nagyszámú szerinproteáz közül az utóbbi időben a humán polimerfragmá leukocitákból felszabadított elasztáz gyógyászati beavatkozások tekintetében jelentőségre tett szert. Ezt fehérvérsejtekből rászák ki pl. oly módon, hogy a fehérvérsejteket opsonált idegentestek vagy oldható serkentő anyagok /pl. formilezett baktériumos peptidok vagy anafilaktin/ által aktiválják /a humán leukocita-elasztáz a továbbiakban "HLE"-nek nevezzük/. A HLE jelentős fiziológiai szerepének a fagocitált mikroorganizmusok vagy fehérjetartalmú sejttörmelék emésztése tekinthető, a HLE azonban az elasztint és kollagént - azaz az elasztikus kötőszövet illetve teljes extracelluláris kötőszövetanyag fontos komponenseit - is lebontja.

Az aktivált HLE fiziológiai körülmények között gyakorlatilag nem mérhető, minthogy α_2 -makroglobulin, α_1 -proteáz-inhibitor / α_1 PI vagy α_1 -antitripszin/ vagy anti-leuko-proteáz /ALP vagy más jelölés szerint "HUSI-I"/ gátolja. A HLE-aktivitás szabályozása tekintetében az α_2 -makroglobulin alárendelt jelentőségű, minthogy asszociációs sebességi állandója / k_{ass} / túlsóttan csekély. Ezzel szemben az α_1 PI és az ALP a felszabadított HLE-t hatékonyan gátolják, ugyanakkor azonban a leukociták aktiválási körülményei között az egyidejűleg felszabaduló oxigénradikál által oxidatív úton könnyen inaktiválódnak.

A leukociták aktiválása - különösen gyulladásos betegségek esetén - egyúttal elasztáz és szuperoxidgyökök felszabadulásához vezet. A szuperoxidgyökök molekuláris oxigénné és hidrogénperoxiddá dismutálódnak. A hidrogénperoxid és szuperoxidgyökök keverékéből a jelenlevő átmeneti fémion-nyomok jelenlétében hidroxilgyökök képződnek, amelyek a α_1 PI és ALP szerinproteáz-inhibitorokat gyorsan inaktíválják. Ez az inaktíválódás továbbá hidrogénperoxid által halogenid-ionok és a mioleperoxidás nevű leukocita-enzim jelenlétében is előidézhető [Flech és tsai: Handbook of Inflammation, 5, 255-281, Elsevier /1985/]. Ugy tűnik, hogy a proteáz-inhibitorok inaktíválása a krónikus és különösen akut gyulladások esetén fellépő szövetkárosodások előfeltétele.

As α_1 PI esetében az inaktíválódás egy speciális metioninmaradék oxidációjára vezethető vissza, amely a HLE aktivitás-tasakjához kötődő fehérjesszakasszon játszódik le. E metionint rekombináns DNS-technológia segítségével valinra lecserélve oxidációs inaktíválódással szemben ellenálló aktiv α_1 PI-analogont nyernek [Rosenberg és tsai: Nature 312, 77-80, /1984/]. Másrésről ismeretes, hogy amennyiben az α_1 PI 358-helyzetében levő metionint argininre cserélik le, úgy a fehérjefunkció megváltozik és a fehérje már nem elasztáz-inhibitorként, hanem trombin-inhibitorként hat [Owen és tsai: New Eng. J. Med. 309, 694-698, /1983/].

A szerinproteázok és szerinproteáz-inhibitorok egyensúlyának felbontásán alapuló betegségek gyógykezelése számára pl. a 36 00 571 Al sz. német szövetségi köztársaságbeli közrebecsajjtási iratban az ott megadott aminosav-szekvenciával ren-

rendelkező fehérjéket javasolnak, amelyek HUSI-I /Humán Seminal-plasma Inhibitor/ - azaz ALP - típusú inhibitorok. A HUSI-I savval szemben stabil proteáz-inhibitor, amely a granulociták lisszosomális granuláiból származó proteázokat /pl. elasztázt is/ gátol. A HUSI-I más intra- és extracelluláris proteázokkal szemben csupán gyengébb gátló aktivitást fejt ki és molekula-tömege kb. 11.000.

A 36 00 571 Al sz. német szövetségi köztársaságbeli közrebocsájtási irat szerinti inhibitor molekulák biológiai aktivitás tekintetében egyrészt a kimotripszin enzim gátlásával, míg immunológiai szempontból másrészt HUSI-I típusú inhibitoroként jellemezhetők.

A "HUSI-I típusú inhibitorok biológiai aktivitásával rendelkező fehérjék" kifejezésen a 36 00 571 Al sz. német szövetségi köztársaságbeli közrebocsájtási iratban a HUSI-I típusú inhibitorok biológiai aktivitását kifejtő olyan fehérjék és fúziós fehérjék értendők, amelyek a HUSI-I típusú inhibitorok biológiai aktivitását mutatják, pl. a természetes fehérjék immunológiai tulajdonságaival és/vagy specifikus gátló tulajdonságaival rendelkeznek. A "HUSI-I típusú inhibitorok biológiai aktivitásával rendelkező fehérjék" külső a 36 00 571 Al sz. német szövetségi köztársaságbeli közrebocsájtási irat értelmében a HUSI-I aminosavszekvenciájának csupán részstartományait magukban foglaló illetve tartalmazó fehérjék és fúziós fehérjék is beletartoznak. A fehérjék aminosav-szekvenciájának fenti részstartományait "tartományoknak" is nevezik.

Az ALP /illetve HUSI-I/ 107 aminosavmaradékot tartalmazó és homológiai megfontolások alapján két inhibitor-tartományból álló régóta ismert és vizsgált fehérje [pl.

Schiessler és tsai: "Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes" - Havemann és tsai kiadó - Urban and Schwarzenberg, Baltimore, München /1978/ 195-207. oldal. Az első /N-terminális/ tartománynak tulajdonítják a tripszinhez hasonló enzimek gátlását, míg a második /C-terminális/ tartomány röntgenkristallográfiai vizsgálatok szerint kimotripszinhez kötődik és feltételezik, hogy ez a tartomány tartalmazza az elasztázgátló hatást is [Grütter és tsai: Embo J. J., 345 és 351, /1988/].

Javasolták már [lásd WO 86/03497, különösen 11-13. oldal] a fenti ismert 107 aminosavat tartalmazó szerinproteáz-inhibitor-fehérje aminosavláncában egy vagy több aminosavmaradék más aminosavmaradéokra történő kicserélését, ezt azonban mindaddig még nem valósították meg. Így feltételezések szerint az arginin /20-helyzet/ lizinre, leucin /72- vagy 74-helyzet/ lizinre vagy argininre és/vagy a metionin /73-helyzet/ lizinre vagy argininre történő lecserélése a tripszinhez hasonló szerinproteázokkal szemben kifejtett gátló hatást fokozzák. Márerről kimotripszinhez hasonló szerinproteázok /beleértve a katepszin G-t/ szemben kifejtett aktivitás növelése céljából a 20-helyzetben /arginin/, 72- vagy 74-helyzetben /leucin/ és/vagy 73-helyzetben /metionin/ levő egy vagy több aminosav fenil-alaninra, tirozinra vagy tryptofánra történő lecserélését javasolták. Ezenkívül pankréas-elasztázhoz hasonló szerinproteázokkal szemben kifejtett gátló hatás javítása céljából a 20-helyzetben /arginin/, 72- vagy 74-helyzetben /leucin/ és/vagy a 73-helyzetben /metionin/ levő egy vagy több aminosav alaninra történő kicserélésére tettek javaslatot.

Másrészről a WO 87/03497 sz. szabadalmi bejelentésben arra utaltak, hogy pl. a 20-helyzetben levő arginin glicinre történő lecserélésével a tripszinnel szemben kifejtett védőhatás, a 73-helyzetben levő metionin illetve a 72- és/vagy 74-helyzetben levő leucin glicinre történő lecserélésével a leukocitén-elasztázzal szemben kifejtett gátló hatás megszűnik.

WO 86/03497 sz. szabadalmi bejelentésben továbbá Rosenberg és tsai korábbiakban idézett közleményében foglalt felismeréséhez csatlakozva javaslatot tettek. Ennek lényege, hogy a proteáz-inhibitor oxidatív inaktiválódással szemben mutatott stabilitásának javítása és egyidejűleg a leukocitén-elasztázzal és katepsin G-vel szemben kifejtett gátló hatásának fokozása céljából a metionint valinra cserélik ki /ennek során azonban nyitva hagyják azt a kérdést, hogy a kívánt hatás elérése céljából a fehérjében levő összes metionin-csoport vagy a négy metionin-csoport közül melyik cserélendő ki vagy pedig a 73-helyzetben levő metionin fenil-alaninnal, tirozinnal vagy triptofánnal történő fentemlitett kicserélésén kívül további átalakításról van szó/.

Bár a WO 86/03497 sz. szabadalmi bejelentésben ismertetett fehérje-inhibitor átalakítási javaslatokat valamint a fehérjék hatásában illetve tulajdonságaiban ezek következtében bekövetkező változásokat kísérleti úton vagy egyéb konkrét adatokkal nem támasztották alá, mindenképpen az a következtetés vonható le, hogy a szakember számára ismert volt, hogy a 20-helyzetben és/vagy 72-74-helyzetekben - különösen a 73-helyzetben - levő aminosavak megváltoztatása előreláthatóan bizonyos meghatározott szerin-proteázokkal szemben kifejtett gátló hatás elvesztéséhez vagy megváltoztatásához vezet illetve

vezethet és a szakember számára egyáltalán nem előrelátható, hogy a fenti aminosavaktól /pl. a 72-74-helyzetekbe, különösen a 73-helyzetbe/ eltérő aminosav-bevitel milyen hatásváltozásokat eredményeznek. Ezt a bizonytalanságot még csak alátámasztja Owen és tsai fentiek során hivatkozott felismerése, amelynek értelmében az α_1 -antitripszin hatása a metionin-maradéknak argininmaradéokra történő kicserélésével megváltozik. Ezzel kapcsolatban figyelembeveendő, hogy Kramps és tsai felismerése értelmében [Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369, Suppl., 83-88, /1988/] az ALP oxidációs inaktiválása a triptikus és elasztolitikus gátló hatás együttes elvesztéséhez vezet. Így tehát - minthogy az 1. tartomány metionint nem tartalmaz - az oxidációs ^{inaktiválódás} \checkmark nem vagy nem csupán a metionin-oxidáción alapul. Nem volt tehát előrelátható, hogy az ALP 2. tartományában lejátszódó teljes vagy részleges metionin-csere aktív, oxidációval szemben ellenálló ALP mutánsokhoz vezet-e.

Mint arra a korábbiakban rámutattunk, ismeretes, hogy az ALP /illetve a HUSI-I típusú proteáz-inhibitorok stb./ mindekséig ismeretlen módon különösen oxidáció következtében gyorsan inaktiválódnak. A fenti típusú leukocita-elasztáz-inhibitorok gyógyászati felhasználása szempontjából nagymértékben kívánatos oxidációval szemben ellenállóbb szerin-proteáz-inhibitorok előállítása.

Találmányunk tárgya eljárás az ALP szerinproteáz-inhibitor olyan új mutánsainak előállítására, amelyek a hiteles humán inhibitor szerkezetét messzemenően megtartják és különösen humán leukocita-elasztázzal /HLE/ szemben kedvező gátló hatást fejtenek ki, ezenkívül további kedvező tulajdonságokkal rendelkeznek, továbbá aktivált leukociták által előidézett

oxidatív inaktiválással szemben a természetes ALP-nél kevésbé érzékenyek vagy teljesen ellenállóak.

Ezen új ALP szerinproteáz-inhibitor mutánsok előállítására a találmányunk szerinti és az alábbiakban ismertetésre kerülő biotechnológiai eljárással történik.

A találmányunk szerinti eljárással előállított szerinproteáz-inhibitor-fehérjék az /I/ általános képletű aminosav-szekvenciákat vagy ezek olyan részstartományait tartalmazzák, amelyek legalább az 53-101-helyzetnek megfelelő szekvenciát magukban foglalják.

A fenti képletben W jelentése tirozin vagy glutaminsav, X_1 , X_2 és X_3 azonos vagy különböző lehet és jelentésük metionin vagy leucin, azonban X_3 fenil-alanint is képviselhet; Y jelentése prolin vagy arginin és Z jelentése leucin vagy - amennyiben W tirozint és X_1 , X_2 és X_3 leucint képvisel - isoleucin is lehet.

Az /I/ általános képletben W jelentése előnyösen tirozin.

A találmányunk szerinti eljárással előállítható /I/ általános képletű új szerinproteáz-inhibitor-fehérjék előnyös csoportját képezik az /Ia/ általános képletű vegyületek vagy ezeknek olyan részstartományai, amelyek legalább az 53-101-helyzetben levő szekvenciát tartalmazzák /mely képletben X_1 , X_2 , Y és Z jelentése a fent megadott és X_3 jelentése metionin vagy leucin/.

Teljes általánosságban - azaz W és Y jelentésétől függetlenül - különösen előnyösen olyan /I/ vagy /Ia/ általános képletű vegyületeket illetve részstartományait állíthatunk elő, amelyekben X_1 , X_2 , X_3 és Z jelentése leucin.

Előnyűsek továbbá azok az /I/ vagy /Ia/ általános képletű vegyületek illetve részstartományaik, amelyekben Y jelentése prolin.

A találmányunk szerinti eljárással előállítható új szerinproteáz-inhibitorok aminosav-szekvenciája előnyösen az /I/ illetve /Ia/ általános képlet 1-107 aminosav-helyzeteit és 48-107, 49-107 illetve 50-107 részszekvenciáit tartalmazza. Találmányunk tárgya továbbá a fenti új szerinproteáz-inhibitorok fúziós fehérjéinek előállítása, különösen N-terminális szignálszekvenciákkal vagy pl. β -galaktosidázzal képezett fúziós fehérjék készítése. Az /I/ illetve /Ia/ általános képletű fehérjékben az N-terminális részstartományban az aszparaginsavig /49-helyzet/ további aminosavak is kicserélhetők, így pl. a WO 8603497 sz. szabadalmi bejelentésben argininre történő lecserélésre leírt módon.

A találmányunk szerinti eljárással előállítható /I/ általános képletű új szerinproteáz-inhibitorok - különösen az Y helyén prolint és Z helyén leucint tartalmazó vegyületek - leukocita-elasztázzal szemben kifejezett gátló hatást mutatnak, azonban pl. kimotripsinnel és - kisebb mértékben - katepszin G-vel, kimázzal és tripsinnel szemben is inhibitor-ként hatnak, oxidációval szemben mutatott nagyobb stabilitás mellett.

Amennyiben az /I/ általános képletű új szerinproteáz-inhibitorokban X_1 , X_2 és X_3 leucint jelent és vagy Y jelentése arginin vagy Z jelentése izoleucin, vagy X_1 , X_2 és Z leucint képvisel és X_3 jelentése fenil-alanin, a termék szubsztrátum-specifitása megváltozik, azaz a vegyület a leukocita-elasztázt kitűnően gátolja, ugyanakkor azonban a

kinotripszinrel és pl. katepszin G-vel szemben mutatott gátló hatás megszűnik. Ezek a vegyületek - különösen amelyekben X_1 , X_2 és X_3 leucint, és Z izolaucint jelent vagy X_1 , X_2 és Z leucint és X_3 fenil-alanint képvisel - a leukocita-elasztás szelektív inhibitorai - /különösen ha csupán az 53-101 helyzet-től a 48-107 helyzetig terjedő szekvenciárészeket magukban foglaló^{egy} tartomány van jelen vagy pl. az /I/ illetve /Ia/ általános képletű vegyületben a 20-helyzetű arginin glicinre történő lecserélése miatt a tripszinnel szemben kifejtett gátló hatás megszűnt/; a vegyületek ezenkívül oxidációval szemben különösen ellenállóak. A találmányunk szerinti eljárással előállítható vegyületek előnyös képviselői továbbá azok az /I/ illetve /Ia/ általános képletű szerinproteáz-inhibitorok /vagy e szekvenciák részstartományai/ amelyekben X_1 és X_2 jelentése leucin, X_3 jelentése leucin és Z jelentése izolaucin vagy X_3 fenil-alanint és Z leucint képvisel. E vegyületcsoportból előnyösek a W helyén tirozint és Y helyén prelint tartalmazó származékok.

A találmányunk szerinti, /I/ illetve /Ia/ általános képletű új inhibitorfehérjék vagy meghatározott részstartományaik előállítására irányuló eljárás DNS szekvenciák előállítását, a fentemlitett új fehérjéket kódoló DNS-szekvenciákat tartalmazó vektorok előállítását, megfelelő gazdaszervezeteknek a vektorokkal történő transzformációját és a kifejezést, majd azt követően az új fehérje izolálását, "refolding"-lépést és tisztítását, adott esetben az /I/ illetve /Ia/ általános képletű aminosav-szekvenciák fentiekben meghatározott részstartományainak előállítása céljából a kapott fehérje

lánchosszának parciális hidrolizissal végzett szekvenciárészek-lehasítással történő megváltoztatását foglalja magában.

As /I/ illetve /Ia/ általános képletű új inhibitor-fehérjék vagy legalább az 53-101 helyzetekben levő részeket magukbanfoglaló szekvenciatartományaik kinyerése céljából először a fenti új inhibitor-fehérjéket kódoló DNS-szekvenciákat illetve az említett DNS-szekvenciákat tartalmazó vektorokat állítjuk elő. Találmányunk előnyös kiviteli alakja szerint 107 aminosavat tartalmazó valamely /I/ illetve /Ia/ általános képletű fehérjét kódoló DNS-szekvenciát szintetizálunk. Találmányunk különösen előnyös kiviteli alakja szerint a 2a., 2b. és 3.-8. ábrán feltüntetett aminosav-szekvenciákat tartalmazó fehérjéket kódoló DNS-szekvenciákat állítunk elő.

A kifejezéshez felhasznált gazdaszervezet /előnyösen E.coli/ kódon felhasználását és az egyenként előforduló restrikciós vágási helyek bevezetésének célszerűségét figyelembe véve a fenti DNS-szekvenciákat a kívánt /I/ illetve /Ia/ általános képletű aminosav-szekvencia alapján a genetikus kód szem előtt tartásával tervezsük meg és szintetizáljuk. A szintézishez célszerűen szintetizátorban kapott DNS-nukleotidokkal /lásd pl. 1. ábra/ megfelelő vektorban - előnyösen ptaCSDT /DSM 5018/ - történő klónozással géneket állítunk elő. Ezek a gének meghatározott /I/ általános képletű fehérjéket kódolhatnak illetve más /I/ általános képletű fehérjék kódolására szolgáló további DNS-szekvenciák elő-génjének szerepét tölthetik be. Az /I/ általános képletű fehérjék közvetlen kódolására alkalmas valamint elő-génként felhasználható gének közül a 2a. és 2b. ábrán feltüntetett ALP 230 és ALP 240 géneket említjük meg. Más /I/ általános képletű fehérjéket kódoló DNS-szekven-

ciáknak az elő-gént tartalmazó plazmidból történő felépítése
 oéljából az említett plazmidot restrikciós endonukleázzal
 - előnyösen Bst EII és Stu I - hasítjuk, majd defoszforilezzük.
 Az /I/ általános képletű szekvencia 66-76 helyzeteiben levő
 aminosavakat kódoló oligonukleotidokat a fenti két hasítási
 hely közé klónozva különböző aminosavszekvenciájú /I/ általános
 képletű vegyületeket kódoló géneket kapunk.

A fentiek során /páronként, azaz M1 és M2, M3 és M4
 illetve M5 és M6/ felhasznált oligonukleotidok az alábbi kép-
 letnek felelnek meg.

3' - GGC CAA GTC GTC GTC GGT GAC TGG CAT CCA TTG - 5' /M1/

3' - G ATG CCA GTC ACG GAC GAC GAC TTG GGC - 5' /M2/

3' - GGC CAA GTC GTC GTA GGT GAC TGG CAT CCA TTG - 5' /M3/

3' - G ATG CCA GTC ACG TAG GAC GAC TTG GGC - 5' /M4/

3' - GGC CAA GTC GTC GTC GGT GAC TGG AAG CCA TTG - 5' /M5/

és

3' - GCTT CCA GTC ACG GAC GAC GAC TTG GGC - 5' /M6/

X₃ helyén fenil-alanint tartalmazó /I/ általános kép-
 letnek megfelelő vegyület esetében az M1-M6 oligonukleotidok
 segítségével felépített plazmidból indulunk ki, amelybe olyan
 oligonukleotidot klónozunk, amely az /I/ általános képletű
 fehérje 96-helyzetében fenil-alanin kifejezését eredményezi.
 A fenti oligonukleotidok közül - pl. amennyiben az /I/ álta-
 lános képletű fehérjében X₁ és X₂ leucint és X₃ fenil-alanint
 jelent és W, Y és Z jelentése a fent megadott - az alábbiakat
 említjük meg:

3' - A GAA CGC AAT CGG GGC AAT TCG GAA CTA TCG TAG
TTG ATC - 5' /E1/

3' - TC GAG CTA CGG GTC AGG TTT GGT CTA GAC TTT ACG
ACG GAG CCA AAG ACG CGA TTT - 5' /E2/

és

3' - A ACT AGG ATA GTT CGG AAT TGG CCC GAT TCG GTT
CTA AAT GCG GTC TTT GGG TCG GTC GTA AAG TCT AGA
GCA AAG GTG ACC GGT AGC - 5' /E3/

Az oligonukleotidot /foszforilezés és hibridizáció után/ oly módon építjük be a megfelelő kiindulási plazmidba, hogy a kiindulási plazmidot előnyösen Sac I és Spe I restrikciós endonukleázzal hasítjuk, szokásos módon defoszforilezzük, majd az ily módon kapott fragmenst a hibridizált E1-E3 oligonukleotidokkal ligáljuk.

Az ily módon kapott plazmidokat ezután előnyösen oly módon alakítjuk át, hogy az expressziós vektorok a megfelelő géneket kétszer /2 stopp-kodon, egy 14-17 - előnyösen 16 - nukleotidot tartalmazó szekvencia, egy Shine-Dalgarno-szekvencia, továbbá egy további 6-9 - előnyösen 7 - nukleotidból álló szekvencia által elválasztva/ a tac-promotor mögött, és egy terminátor-szekvencia által követve hordozzák. E célra különösen előnyösen alkalmazhatunk egy Jorgensen és tsai [J.Bact. 138, 705-714 /1979/] által leírt terminátor-szekvenciát [a tetA/orfI-terminátor].

Találmányunk tárgya továbbá megfelelő gazdaszervezetek transzformálása a fentiekben illetve a példákban leírt módon nyert vektorokkal és az előállítandó /I/ illetve /Ia/ általános képletű fehérjék vagy pl. fúziós fehérjék kifeje-

sése, majd azt követő izolálása, "refolding" lépés és tisztítása, majd adott esetben a lánchossz megváltoztatása részleges hidrolízis útján. A részleges hidrolízis során a 48-helyzet - különösen az 50-helyzet - előtt N-terminálisan vagy a 101-helyzet mögött C-terminálisan elhelyeszkedő szekvenciárszeket hasítjuk le.

Gazdaszervezetként előnyösen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus carnosus* vagy más gram-positív vagy gram-negatív baktériumok, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces* törzsek, más mikroszkóposan kicsiny gombák, pl. *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* stb., továbbá állati vagy emberi sejtek alkalmazhatók. Gazdaszervezetként előnyösen *E. coli* törzsek alkalmazhatók, különösen a K12 alcsoportba tartozó törzsek, mint pl. *E. coli* K12 JM 101 /ATCC 33876/, *E. coli* K12 JM 103 /ATCC 39403/, *E. coli* K12 JM 105 /DSM 4162/ vagy *E. coli* K12 DHL /ATCC 33849/.

A fenti gazdaszervezetek transzformálásához és a fentemlitett fehérjék kifejezéséhez vektorként plazmidokat alkalmazhatunk. E célra előnyösen pl. pBR 322 vagy abból lezármastatható plazmidok továbbá vírusgenomok, mint pl. Lambda-Phagen genom vagy Phagen M13 genom használható. A kereskedelmi forgalomban levő expressziós vektorok közül pl. az alábbiak alkalmazhatók: pUC 9, pUC 12, pUC 13, pUC 18, pUC 19, pPL-Lambda, pKK 233-2, pKK 223-3, pYEJ 001, pTZ 18R, pTZ 19R, pUB 110, pWH 418, pDH 32, pJDB 207, pAN 7-1, p35R₂, pSVL, pKSV és mások.

Az expresszió bevezetése a tac-promotert tartalmazó *E. coli* kifejező rendszerbe pl. glükózselvenással vagy előnyösen isopropil- β -D-tiogalaktopiranozid hozzáadásával történhet.

A képződő fehérjét izoláljuk, kromatográfiásan előtisztítjuk, majd pl. karbamid vagy guanidin-hidroklorid jelenlétében illetve valamely tiolt és disszulfidot tartalmazó pufferrendszer jelenlétében "refolding"-eljárásnak vetjük alá. A kívánt terméket végül kromatográfiás úton tisztítjuk.

Az /I/ illetve /Ia/ általános képletű fehérjék vagy legalábbis a 49-101 szekvenciárészt tartalmazó részstartományaik illetve a termékek N-terminális fúziós fehérjéik 49-50 helye-
teiben levő savra érzékeny aszparaginsav-prolin-kötés jelen-
léte miatt lehetőség nyílik a fehérjék illetve fúziós fehér-
jék 50-helyete előtt levő valamennyi szekvenciárész lehasi-
tására és így módon az /I/ illetve /Ia/ általános képletű ve-
gyületeknek a 50-101-től 50-107-ig terjedő szekvenciartományo-
kat magukbanfoglaló C-terminális tartományainak előállítására.
E célból a kiindulási fehérjét illetve fúziós fehérjét /a
49-helyzet előtti szekvenciákkal/ pl. 70 %-os hangyasavval
szobahőmérsékleten 24-36 órán át kezeljük vagy hasonló savas
ágenssel reagáltatjuk, majd az intakt C-terminális tartományt
kromatográfiás úton izoláljuk, majd tisztítjuk.

X_1 és X_2 helyén leucint és X_3 helyén leucint vagy
fenil-alanint tartalmazó /I/ illetve /Ia/ általános képletű
vegyületek vagy részstartományaik előállítására esetén önmagában
ismert módon úgy is eljárhatunk, hogy a terméket kódoló DNS-
szekvenciára 5'-terminálisan metionint kódoló ATG kodont ik-
tatunk be. Ez egy fúziós fehérje kifejezésekor a kívánt fe-
hérje N-végcsoportja előtt további Met⁻¹ aminosavat eredményez,
amely esetén szokásos módon /pl. bróm-ciános hasítással/
hosszúsítható.

Márésarról a kapott fehérje C-terminális végéről a 107-102 helyzetekben /a 107-helyzetű alaninnal kezdődően/ levő aminosavak közül az összes vagy egy-öt aminosav enzimatikusan /pl. karboxipeptidázok segítségével/ lehasítható.

As ily módon kapott különböző lánc hosszúságú inhibítorokat pl. ELISA-teszt segítségével kvantitatíven meghatározhatjuk; ennek során egy poliklonális anti-teszt hiteles humán ALP-vel szemben alkalmazhatunk.

As alábbiakban alkalmazott rövidítések jelentése a következő:

ALP	/természetes/ antileukoproteáz
bp	bázispárok
Chloramin T	N-klór-p-toluolszulfonamid-nátriumsó
DTT	ditiotreit
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
HEPES	2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazin]-etán-szulfonsav
HLE	humán leukocita-elasztáz
IPTG	isopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
PMA	forbél-mirisztol-acetát
SD-szekvencia	Shine-Dalgarno-szekvencia
Tris	trisz-hidroximetil-aminometán
Triton ^R /-X-100	oktil-fenoxi-dekaetoxi-etanol /vagy Octoxynol-10/.

A találmányunk szerinti eljárással előállított fehérjéknek humán leukocita elasztázzal /HLE/ szemben mutatott gátló hatását természetes ALP-vel megfelelő hatásával az alábbi teszt segítségével hasonlítjuk össze:

A HLE aktivitás meghatározását 25 °C-on kromogén metoxiszuksinil-L-alanil-L-alanil-L-prolil-L-valil-p-nitro-anilid szubsztrátummal /="HLE-szubsztrátum", Protogén/ határozzuk meg; [Geiger és tsai J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 821, /1985/]. A HLE-aktivitás meghatározásához az alábbi kísérleti körülményeket alkalmassuk: 0,1 M HEPES, pH 7,5, 30 mM HLE /törzsoldat: 0,83 μ M, 2,5 mM HCl/ és 0,3 mM HLE-szubsztrátum. A reakciót oly módon indítjuk be, hogy 0,1 M HEPES-t és 30 mM HLE-t tartalmazó reakcióelegyhez HLE-szubsztrátumot adunk. Tíz perces 25 °C-on végzett inkubálás után a reakciót 0,6 M ecetsav értékre beállítva leállítjuk. Referens kísérletként HLE nélkül párhuzamos inkubálást hajtunk végre. Az abszorpció-változást /10 perc 405 nm mellett meghatározzuk. Az /I/ általános képletű vegyület illetve ALP gátló aktivitásának meghatározása céljából az inhibitorert növekvő mennyiségben adjuk hozzá, állandó HLE-koncentráció /30 mM/ mellett 10 percen át 25 °C-on előinkubáljuk, majd a reakciót a fentiekben ismertetett módon beindítjuk, leállítjuk és mérjük. A HLE gátlását ALP illetve különböző /I/ általános képletű vegyületek jelenlétében %-os HLE-aktivitásként az inhibitor-koncentráció függvényében ábrázoljuk /9. ábra/.

A találmányunk szerinti eljárással előállított fehérjék valamint természetes ALP /kontroll/ szarvasmarha hasnyálmirigyből nyert kimotripsinnel szemben kifejtett gátló aktivitását a következőképpen mérjük:

A kimotripsin /Boehringer Mannheim/ aktivitását kromogén szuksinil-L-alanil-L-alanil-L-prolil-L-fenil-alanin-p-nitroanilid szubsztrátumon /="kimotripsin-szubsztrátum",

Protogén/ határozzuk meg [Geiger: Methods of Enzymatic Analysis, 5. kötet, 99-109. oldal, Verlag Chemie, /1984/]. Az alábbi kísérleti körülményeket alkalmassuk: 0,1 M triss-HCl, pH 7,8 20 mM CaCl₂, 0,8 mM Triton-X-100, 2,8 mM kimotripszin /törzsoldat: 100 nM kimotripszin, 2,5 mM HCl, 0,8 mM Triton-X-100/ és 0,15 mM kimotripszin-szubstrátum. A reakciót oly módon indítjuk be, hogy 2,8 nM kimotripszint a fenti pufferben tartalmazó reakcióelegyet 0,15 mM kimotripszin-szubstrátum értékre állítunk be, majd 15 percen át 25 °C-on inkubáljuk, és utána a reakciót 0,6 M ecetsav értékre történő beállítással leállítjuk. Referens kísérletet párhuzamosan, kimotripszin nélkül végzett inkubálással hajtunk végre. Az abszorpció-változást /15 perc 405 nm mellett mérjük. Megfelelően kialakított rendszerekben a vizsgált inhibitor [ALP és /I/ általános képletű vegyületek] emelkedő koncentrációban hozzáadva 2,8 nM kimotripszin-koncentráció mellett 10 percen át 25 °C-on előinkubálunk, majd a mérést a fentiekben leírt módon hajtjuk végre. A kimotripszin gátlását %-os kimotripszin-aktivitás formájában az inhibitor-koncentráció függvényében ábrázoljuk /10. ábra/.

A katepszin G /Calbiochem GmbH/ aktivitását ugyanazok "kimotripszin-szubstrátummal" /Protogén/ határozzuk meg. Az alábbi kísérleti körülményeket alkalmassuk: 0,1 M triss-HCl, pH 8,0 0,2 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,8 mM Triton-X-100, 100 nM katepszin G /törzsoldat: 4 μM katepszin G, 50 mM nátrium-acetát, pH 4,0, 0,7 M NaCl, 16 mM Triton-X-100/ és 0,4 mM kimotripszin-szubstrátum. A vizsgált inhibitor növekvő mennyiségben és 100 nM katepszin G-t tartalmazó elegyet 20 percen

át 25 °C-on inkubáljuk, majd a reakció beindítása céljából kinotripszin-szubstrátummal elegyítjük, 20 percen át 25 °C-on inkubáljuk, végül a reakciót oly módon állítjuk le, hogy az elegyet 0,6 M ecetsav értékre beállítjuk. Az abszorpció változását/20 perc 405 nm mellett meghatározzuk. Katepszin G illetve inhibitor hozzáadása nélkül valamint további párhuzamos inkubálással referens kísérleteket hajtunk végre.

A találmányunk szerinti eljárással előállított fehérjék és ALP /kontroll/ oxidációs inaktiválással szemben mutatott ellenállását egyrésztől Chloramin T segítségével, másrésztől aktivált leukocitákkal történő inkubálással határozzuk meg. Az alábbi kísérleti körülményeket alkalmazzuk:

a./ Chloramin T hatása

A vizsgált inhibitor állandó mennyiségeit Chloramin T /kémiai oxidálószer/ növekvő koncentrációival inkubáljuk, a HLE-gátló kapacitás meghatározása előtt. Az inhibitor Chloramin T-vel történő kezelését és a HLE-mérést 37 °C-on 0,7 ml alábbi összetételű pufferben végessük el: 50 mM trisz-HCl, pH 8,5, 100 mM NaCl, 0,8 mM Triton-X-100. 0,1 µg /8,5 µmol/ ALP-t illetve /I/ általános képletű vegyületet 0,05-3 µmol Chloramin T-vel 15 percen át inkubálunk. A HLE gátló aktivitás meghatározása céljából 0,2 µg /8,3 µmol/ HLE-t adunk hozzá, 5 percen át inkubáljuk, majd a "HLE-szubstrátumos" /Protegen; lásd lent/ reakciót beindítjuk. A reakciót 5 perc elteltével 0,6 M ecetsav értékre történő beállítással leállítjuk. Az abszorpció változását 405 nm mellett mérjük. Kontrollként az alábbi meghatározásokat végessük el párhuzamos inkubálással:

- a/ inhibitor, HLE és Chloramin T nélkül /referens/;
- b/ inhibitor és Chloramin T nélkül /100 %-os HLE aktivitás/; és
- c/ Chloramin T nélkül /inhibitor aktivitás oxidatív befolyásolás nélkül/.

További kontroll kísérletben azt találtuk, hogy 0,05-3 μ mól Chloramin T a HLE aktivitást nem befolyásolja. Az ALP-vel és /I/ általános képletű vegyülettel, valamint Chloramin T-vel végzett kezelés hatását a 11. ábrán tüntetjük fel.

b./ Aktivált leukocitákkal végzett inkubálás

A természetes viszonyokat jobban visszatükröző fenti kísérletnél frissen izolált leukocitákat ALP illetve /I/ általános képletű inhibitor jelenlétében phorbol-mirisztil-acetát /PMA/ segítségével in vitro szuperoxidgyök képzésnek vetünk alá. A kiindulási és inaktiválás utáni gátló aktivitást HLE-teszt segítségével meghatározzuk. Minden kísérletben $0,5 \times 10^6$ izolált humán leukocitát konstans mennyiségű inhibitorral /0,3 μ g/ "HBSS-pufferben" [8 g/l NaCl, 6 g/l HEPES, 0,4 g/l KCl, 0,35 g/l NaHCO₃, 0,06 g/l Na₂HPO₄, 0,06 g/l KH₂PO₄, 1 g/l glükóz pH 7,4] 37 °C-on 10 percen át inkubálunk. A sejteket PMA hozzáadásával /30 ng/ml/ stimuláljuk, 37 °C-on 30 percen át inkubáljuk, majd centrifugálással /2500 g, 5 percen át, 4 °C-on/ szedimentáljuk. A sejtmentes maradékot a gátlás méréséhez a HLE-tesztben 0,4 μ g /16,6 pmól/ HLE-vel alkalmazzuk /lásd fent/. Párhuzamos kísérletekben azonos inhibitor-mennyiséget nem-stimulált leukocitákkal illetve leukociták nélkül vizsgálunk. További kontrollkísérleteket inhibitor nélkül hajtunk végre /lásd 12. ábra/.

A fenti és további tesztek tanúsága szerint a természetes ALP - várható módon - a HLE, kimotripszin, katepszin G és tripszin működését gátolja, ugyanakkor azonban Chloramin T vagy aktivált leukociták hatására messzemenően inaktiválódik.

Meglepő módon azt találtuk, hogy amennyiben pl. a természetes ALP 73-helyzetében levő metioninmaradékot leucinra lecseréljük - azaz olyan /I/ általános képletű fehérjét képezünk, amelyben W jelentése tirozin, X_1 , X_2 és X_3 jelentése metionin, Y jelentése prolin és Z jelentése leucin /"ALP 242"/ - úgy a HLE-vel szemben kifejtett gátló hatás csupán jelentéktelen mértékben /9. ábra/ és a kimotripsinnel szemben mutatott gátló hatás egyáltalán nem változik. ^{/10. ábra/.} Ezzel szemben ez az /I/ általános képletű vegyület /ALP 242/ Chloramin T vagy aktivált leukociták hatására számottevően kisebb mértékben inaktiválódik, mint a hiteles ALP /11. és 12. ábra/. A fenti vizsgálatok bizonyítják, hogy a találmányunk szerinti eljárással előállított termékek biostabilitása a gyógyászati felhasználás körülményei között kifejezetten nagyobb.

A találmányunk szerinti eljárással előállított szerin-proteáz-inhibitorok egyes képviselőivel kapott vizsgálati eredményeket a 9.-12. ábrán részletesen mutatjuk be. Az alábbi táblázatban a 107 aminosavat tartalmazó /I/ általános képletű fehérjék néhány képviselőivel kapott, fentismertetett és további vizsgálati eredményeket foglalunk össze:

Inhibitor- termék	A megadott enzim maradék- aktivitása, az inhibitor behatása után			Maradék elasztáz-aktivi- tás, az alábbi oxidáló- szerekkel kezelt inhibi- terek behatása után	
	HLE /1/	Chymotr. /2/	Catheps.G /3/	Chloramin T /4/	Akt.leukocidák /5/
ALP 230	15 %	87 %	90 %	32 %	12 %
ALP 231	4 %	32 %	56 %	3 %	4 %
ALP 232	24 %	100 %	99 %	53 %	10 %
ALP 236	7 %	35 %	35 %	21 %	n.v.
ALP 237	8 %	83 %	82 %	34 %	n.v.
ALP 240	4 %	47 %	75 %	47 %	36 %
ALP 242	6 %	17 %	5 %	45 %	16 %
ALP 246	3 %	11 %	30 %	54 %	n.v.
Összehasonlítás					
ALP	6 %	11 %	1 %	75 %	37 %

n.v. = nem vizsgáltuk

/1/ Az alábbi /I/ általános képletű vegyületeket alkalmasszuk:

Termék száma	W	X ₁	X ₂	X ₃	Y	Z
ALP 230	Tyr	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu
ALP 231	Tyr	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu
ALP 232	Tyr	Leu	Leu	Leu	Pro	Ile
ALP 236	Glu	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu
ALP 237	Tyr	Leu	Leu	Phe	Pro	Leu
ALP 240	Tyr	Met	Met	Met	Arg	Leu
ALP 242	Tyr	Met	Met	Met	Pro	Leu
ALP 246	Glu	Met	Met	Met	Pro	Leu

- /2/ A teszt során a HLE koncentráció 30 nM. A táblázatban a 60 nM koncentrációban alkalmazott inhibitor behatása után visszamaradó elasztáz-aktivitást adjuk meg.
- /3/ A kimotripszin koncentráció 2,8 nM. A táblázatban a 4,8 nM koncentrációban alkalmazott inhibitor behatása után megmaradó kimotripszin-aktivitást adjuk meg.
- /4/ A katepszin G koncentrációja 100 nM. A táblázatban 100 nM koncentrációban alkalmazott inhibitor behatása után megmaradó katepszin G aktivitást adjuk meg.
- /5/ A 0,1 μg inhibitor és 3 μmol Chloramin T-t tartalmazó eleggyel 15 percen át 37 °C-on végzett inkubálás után megmaradó elasztáz-aktivitást adjuk meg /a beadagolt HLE mennyisége 0,2 μg /.
- /6/ Előzetesen pforbel-mirisztill-acetáttal aktivált polimerfogó leukocitákkal / $0,5 \times 10^6$ sejt/ inkubált 0,3 μg inhibitor-fehérje jelenlétében megmaradó aktivitást adjuk meg /kiindulási elasztázmenyiség 0,4 μg /.

A táblázat adataiból kitűnik, hogy az /I/ általános képletű új szerinproteáz-inhibitorok humán leukocita elasztázal szemben jó gátló hatást mutatnak, amely kimotripszin ellen kifejtett jó gátló hatással párosul /amennyiben Z jelentése leucin és X_3 jelentése fenil-alanin^{eltér}/. A táblázatból továbbá látható, hogy ezek az /I/ általános képletű vegyületek, amelyekben X_1 , X_2 , X_3 és Z közül legalább az egyik leucint jelent, oxidatív inaktiválással szemben kifejezetten

stabilak. Az oxidációs behatással szemben mutatott stabilitás kémiai /Chloramin T/ és enzimes behatások esetén egyaránt megfigyelhető.

Különösen meglepő, hogy az X_1 , X_2 , X_3 és Z helyén leucint tartalmazó /I/ általános képletű vegyületek /különösen az ALP 231 vegyület, amelyben W jelentése Tyr és Y jelentése Pro/ HLE és kimotripszin ellen ugyanolyan magas aktivitást mutatnak, mint az ALP és ezek a vegyületek PMA-val /az oxigén-gyökképződés legerősebb stimulátora/ kezelt $0,5 \times 10^6$ leukocitákkal végzett 30 perces inkubálás hatására egyáltalán nem vagy csupán jelentéktelen mértékben inaktiválódnak. Az ALP 231 jelzésű termék a magasfokú gátló aktivitás és oxidálószerrek okozta erős ellenállóképesség társulása révén a gyógyászatban a korábbiakban felsorolt betegségek kezelésénél igen eredményesen alkalmazható értékes gyógyászati hatóanyag.

A táblázatból továbbá látható, hogy az ALP 232 jelű vegyület értékes tulajdonságokkal rendelkezik. Az ALP 232 jelű vegyület az ALP 231 jelzésű származéktól csupán abban különbözik, hogy Z isoleucin-maradékot képvisel. Az ALP 232 - az ALP 231-hez hasonlóan - aktivált leukociták által előidézett oxidatív inaktiválódással szemben kifejezetten ellenálló, ugyanakkor azonban megváltozott a szubsztátum-specifikusságú inhibitor. Az ALP 232 ugyanis a korábban említett módon HLE működését szintén gátolja, ugyanakkor azonban kimotripsinnel és katepszin G-vel szemben hatástalan.

Amennyiben az ALP 231 jelű vegyületben csupán az X_3 helyén levő leucint fenil-alaninra cseréljük le, szelektíven nagyhatású és javított oxidációstabilitással rendelkező HLE-inhibítort /ALP 237/ nyerünk. Minthogy a proteázok közül a

patológiai körülmények között lejátszódó szövetkárosodásért túlnyomórészt az elasztáz felelős, a fenti szelektív inhibitorok kifejezett biostabilitásuk figyelembevételével a gyógyászatban további haladást jelentenek.

A találmányunk szerinti eljárással előállítható új szerinproteáz-inhibitorok a gyógyászatban különböző betegségek megelőzésére és kezelésére felhasználható értékes gyógyászati hatóanyagok. Az /I/ általános képletű vegyületek pl. krónikus és akut gyulladásos folyamatok kezelésére, valamint emphysemák és tüdőödéma kialakulásának megakadályozására, valamint tumor-invázió megelőzésére alkalmazhatók. A találmányunk szerinti eljárással előállítható új vegyületek továbbá sokkos állapotok kezelésére és megelőzésére valamint pl. hiperfibronilízis alapján operáció után fellépő vérzésnek kezelésére alkalmazhatók. Az /I/ illetve /Ia/ általános képletű vegyületek valamint szerinproteáz-inhibitor hatású részstartományaik továbbá szövetdegeneratív megbetegedések /pl. reumatoid arthritis vagy osteoarthritis/ kezelésére alkalmazhatók.

A találmányunk szerinti eljárással előállítható szerinproteáz-inhibitor-fehérjéknek a fenti betegségek kezelése illetve megelőzése során alkalmazandó dózisa az adagolás módjától és formájától függ és különösen a terápia megkezdésekor fennálló betegstádiumtól függően a kezelőorvos által az adott eset körülményeinek figyelembevételével kerül megállapításra. Általános irányelvként megállapítható, hogy parenterális adagolás esetén az egyszeri dózis 100-5000 mg, előnyösen 100-3000 mg szerinproteáz-inhibitor fehérje. A fenti adatok pl. Egbring és tsai, megállapításával Üssshangban állnak

[Blood 49, 219-231 /1977/], amelynek értelmében felnött szepszis-betegok esetében naponta legalább 1 g leukocitén-elasztás szabadul fel és a gyógykezeléshez a kb. 6-10-szeres meláris fülöslegben beadott találmányunk szerinti eljárással előállított fehérje gátlására van szükség.

Találmányunk tárgya továbbá eljárás hatékony mennyiségű /I/ illetve /Ia/ általános képletű aminosav-szekvenciát vagy részstartományát /legalább az 53-101 helyzetben levő szekvenciát/ magában foglaló fehérjét és szekáncs gyógyászati hordozóanyagokat és/vagy higitóanyagokat és/vagy segédanyagokat tartalmazó gyógyászati készítmények előállítása. A gyógyászatban a találmányunk szerinti eljárással előállított fehérjéket steril izotoniás oldat vagy intramuszkuláris, intravénás vagy szubkutáncs injekció segítségével juttatjuk a gyulladás területére vagy adott esetben infúzió segítségével adhatjuk be. Az /I/ általános képletű új fehérjéket továbbá spray vagy inhalációs készítmény formájában is alkalmazhatjuk, éspedig különösen előnyösen a légsóutak megbetegedéseinek kezelésére, a hatóanyagnak a hörgők és tüdő megtámadott részeire történő közvetlen felvitele útján.

AN ábrák értelmezése a következő:

1a. - c. ábra: AN "ALP 230 gén" és "ALP 240 gén" /lásd 2a. és

2b. ábra/ DNS szekvenciák szintézisének felhasznált 16 oligonukleotid szekvenciái.

2a. ábra: AN "ALP 230" aminosav-szekvenciájá fehérjét /X₁, X₂, X₃ és Z helyén leucint, W helyén tirozint és Y helyén arginint tartalmazó /I/

általános képletű vegyület/ kódoló és a 3., 4. és 5. ábrán feltüntetett DNS-nukleotid-szekvenciák "elő-génjeként" szolgáló "ALP-230 gén" DNS-nukleotid-szekvenciája.

2b. ábra:

As "ALP-240" aminosavszekvenciájú fehérjét /W helyén tirozint, X_1 , X_2 és X_3 helyén metionint, Y helyén arginint és Z helyén leucint tartalmazó /I/ általános képletű vegyület/ kódoló és a 7. és 8. ábrán feltüntetett DNS-nukleotid-szekvenciák "elő-gén"-jeként szolgáló "ALP-240 gén" DNS-nukleotid-szekvenciája.

3. ábra:

As "ALP-231" aminosavszekvenciájú fehérjét / X_1 , X_2 , X_3 és Z helyén leucint, W helyén tirozint és Y helyén prolint tartalmazó /I/ általános képletű vegyület/ kódoló és a 6. ábrán feltüntetett DNS-nukleotid-szekvencia felépítésére is szolgáló ALP-231 gén DNS-nukleotid-szekvenciája.

4. ábra:

As "ALP-232" aminosav-szekvenciájú fehérjét /W helyén tirozint, X_1 , X_2 és X_3 helyén leucint, Y helyén prolint és Z helyén isoleucint tartalmazó /I/ általános képletű vegyület/ kódoló ALP-232 gén DNS-nukleotid-szekvenciája.

5. ábra:

As "ALP-236" aminosav-szekvenciájú fehérjét /W helyén glutaminsavat, X_1 , X_2 , X_3 és Z helyén leucint és Y helyén prolint tartalmazó /I/ általános képletű vegyület/ kódoló ALP-236 gén DNS-nukleotid szekvenciája.

6. ábra: Az "ALP-237" aminosav-szekvenciájú fehérjét /W helyén tirozint, X_1 , X_2 és Z helyén leucint, X_3 helyén fenil-alanint és Y helyén prolánt tartalmazó /I/ általános képletű vegyület/ kódoló ALP-237 gén DNS-nukleotid-szekvenciája.
7. ábra: Az "ALP-242" aminosav-szekvenciájú fehérjét /W helyén tirozint, X_1 , X_2 és X_3 helyén metionint, Y helyén prolint, és Z helyén leucint tartalmazó /I/ általános képletű vegyület/ kódoló ALP-242 gén DNS-nukleotid-szekvenciája.
8. ábra: Az "ALP-246" aminosav-szekvenciájú fehérjét /W helyén glutaminsavat, X_1 , X_2 és X_3 helyén metionint, Y helyén prolint és Z helyén leucint tartalmazó /I/ általános képletű vegyület/ kódoló ALP-246 gén DNS-nukleotid-szekvenciája.
9. ábra: Hiteles ALP és az /I/ általános képletű vegyületek HLE gátló hatása /a tesztet a 19. oldalon ismertetjük/.
10. ábra: Hiteles ALP és az /I/ általános képletű vegyületek kimotripszin gátló hatása /a tesztet a 20. oldalon ismertetjük/.
11. ábra: Hiteles ALP és az /I/ általános képletű vegyületek aktivitásának változása Chloramin T-vel 37 °C-on végzett kezelés hatására. Az ábrán a Chloramin T/inhibitor rendszer /0,1 μ g inhibitor, növekvő Chloramin T koncentráció; a kísérlet leírását a 21. oldalon ismertetjük/ 0,2 μ g

HLE^{-re} kifejtett hatása után 37 °C-on megmaradó HLE-gátló aktivitást tüntetjük fel.

12. ábra: Hiteles ALP és az /I/ általános képletű vegyületek oxidatív kezelése aktivált polimorf magú leukocitákkal /a kísérletet a 22. oldalon ismertetjük/. Kontroll kísérletben 0,4 µg HLE aktivitását 100 %-os HLE-aktivitásnak tekintjük /"a-kontroll"/. A "b-kontroll" oszlopban a felülírásban PMA által nem stimulált leukociták relatív HLE-aktivitását mutatjuk be. A "c-kontroll" a PMA által stimulált leukociták relatív HLE-aktivitása. A hatóanyaggal végzett tesztek esetében az egyes oszlopok mindenkor a megmaradó relatív HLE-aktivitást ábrásolják, és pedig /1/ nem-aktivált inhibitor jelenlétében; /2/ nemstimulált leukocitákkal inkubált inhibitor jelenlétében; és /3/ PMA által stimulált leukocitákkal inkubált inhibitor jelenlétében.
13. ábra: A ptaoSDT /DSM 5018/ plazmid váslatos ábrásolása.
- 14a. ábra: A pALP 23 plazmid illetve ALP-230 gén szintézis stratégiájának váslata. Jobboldalon felül a D21, D22, D23, D21a, D22a és D23a oligonukleotidokat /lásd 1b. ábra/ tüntetjük fel, amelyeket foszforilozás és hibridizálás után a BamHI és SpeI által hasított és alkálikus foszfatással defoszforilozott ptaoSDT plazmiddal ligálunk. A kapott pALP 22 közbenső termék többek között a fekete

oszloppal jelölt 189 bp BamHI-SpeI-DNS fragmenst tartalmazza. NdeI és BamHI segítségével végzett hasítás és defoszforilezés után a terméket az 5'-terminálisan foszforilezett és egymással hibrilisált D11, D12, D13, D11a, D12a^{és D13a} oligonukleotidokkal /lásd 1a. ábra/ ligáljuk. Az ily módon nyert pALP 23 plazmid tartalmazza az ALP-230 gént /fekete oszloppal ábrázoljuk; lásd 2a. ábra/.

14b. ábra:

Ezen az ábrán a pALP 24 plazmid illetve ALP-240 gén szintézis-stratégiáját tüntetjük fel. A jobboldalon felül feltüntetett D24, D25, D24a és D25a oligonukleotidokat /1c. ábra/ 5'-terminálisan foszforilezzük, egymással hibrilisáljuk és a StuI és SpeI által hasított, majd defoszforilezett pALP 23 plazmiddal ligáljuk. A kapott pALP 24 plazmid tartalmazza a fekete oszlopként ábrázolt ALP-240 gént /2b. ábra/.

15. ábra:

A pALP 2312 plazmid váslatos ábrázolása. Ez a plazmid a tac-promotor és egy első Shine-Dalgarne szekvencia mögött 7 nukleotid távolságban az ALP-231 gént kétszeresen tartalmazza. Az első gén két stop-kodonja után 16 nukleotid távolságban a második Shine-Dalgarne-szekvencia, majd újabb 7 nukleotid távolságban a második gén következik. Ezt a második gént végül a tetA/orf I-terminátor flankirozza.

A 14-15. oldalon illetve az la.-lc. ábrán feltüntetett kóplett oligodesoxiribonukleotidokat 1, μ M léptékben az Adams és Tsai-féle szilárdfázisú módszerrel [J. Am. Chem. Soc. 105, 661 /1983/] DNS-szintetizátor /New Brunswick Scientific Co. Modell 8600 oég^VBioscience^Vmodellje/ segítségével állítjuk elő. Monomer szintenként a mindenkor szükséges desoxiribonukleotid kereskedelmi forgalomban levő β -cianoetil-védett diisopropilamino-foszforamiditjét alkalmassuk. A hordozóról történő lehasítás után a végállásban még tritilcsoporttal védett szálakat steril körülmények között gélmezővel sómentesítjük és előtisztítjuk, majd két lépésben "fordított fázisú" HPLC segítségével első tisztításnak vetjük alá. A mindenkori főterméket detritilezzük és két további "fordított fázisú" HPLC tisztítási lépés után gélelektroforézis analízis /PAGE/ alapján nagy tisztaságú kivánt oligonukleotidot kapunk.

A kiviteli példák szerint felhasznált restriktions enzimek kereskedelmi forgalomban levő anyagok [lásd pl. Nachr. Chem. Techn. Lab. 35, 939 /1987/]. A többi enzim beszerzési forrását megadjuk.

A kiviteli példákban az /I/ általános kóplettü vegyületek részére szolgáló expressziós vektorok felépítéséhez a pTacSDT /DSM 5018/ plazmidet alkalmassuk, amely a hatékony expressziós kitermeléshez szükséges valamennyi regulatív elemet tartalmazza. Ez olyan pBR322-ásvázis, amelynek az HaeI-restriktions vágási helyét /korábbi 2296 helyzet/

HaeI segítségével történő hasítással, DNS-polimeráz I-el /Klenow-fragmens; Boehringer Mannheim/ végzett "betöltés"-sel és T4 DNS-ligázzal /Bethesda Research Labs. "BRL"/ végzett újraligálással tövültük. Az

BoerV-NruI-fragmenst /korábbi 189-973 helyzet/ mindkét ansimmel végzett hasítással, majd T4-DNS-ligázzal végrehajtott azt követő újraligálással töröltük. A ptaeSDF kiindulási expressziós plazmid továbbá egy tac-promotert [Amann és tsai: Gene 25, 167-178, /1983/; de Boer és tsai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21-25, /1983/], egy Shine-Dalgarno-szekvenciát, a tetA/oxFL-terminátort /Jorgensen és tsai fentidézett közleménye/, továbbá az ampicillin-rezisztens gént tartalmazza. Az egyes elemek kicserélésének biztosítása céljából^a regulatív elem^{ket} az egyenként előforduló restriktions vágási helyek szegélyezik. A ptaeSDF plazmidot vázlatosan a 13. ábrán tüntetjük fel.

A találmányunk szerinti eljárással előállított plazmidoknak a megfelelő gazdaszervezetekben történő kifejezése után képezett /I/ illetve /Ia/ általános képletű fehérjéket a 7b. példában az ALP 231 inhibitor fehérjére leírt módon a gazdaszövetmasszából izoláljuk, újrahajtogatásos /refolding/ eljárásnak vetjük alá, majd tisztítjuk. Célszerűen járhatunk el oly módon, hogy finontisztítás céljából a befejező dialízis előtt további "fordított fázisú" HPLC kromatográfiát iktatunk be, Nucleosil C 18-on /Macherey és Nagel cég/ acetonitril/trifluor-ecetsav gradiens szerint víz/trifluor-ecetsav elegyben. A HPLC tisztításnál pl. az alábbi körülményeket alkalmazhatjuk.

Osztóp nagyság:	0,72 x 25 cm
Hőmérséklet:	25 °C
Átfolyási sebesség:	1,6 ml/perc
A-puffer:	0,05 % trifluor-ecetsav vízben
B-puffer:	0,025 % trifluor-ecetsav acetonitrilben

- 35 -

Gradiens: 0. - 56. perc 42 % B-puffer /a maradék: A-
-puffer/
56. - 70. perc 60 % B-puffer
70. - 75. perc 0 % B-puffer
Detektálás: 2,14 nm-nél.

As inhibitor-fehérjét tartalmazó frakciót vákuumban bepárooljuk, majd továbbkezelés előtt pl. 20 mM nátrium-acetát-pufferben /pH 5,4/ felvesszük.

Ily módon a kívánt inhibitor-fehérjét 90 %-nál nagyobb tisztaságban kapjuk.

Eljárásunk további részleteit az alábbi példákban ismertetjük anélkül, hogy találmányunkat a példákra korlátozanduk.

1. példa

A leírásban ismertetett stratégiának megfelelően előbb a pALP 23 plazmidot alakítjuk ki a ptacSDT /DSM 5018/ plazmidban illetve az ALP-230 gént klónozzuk.

a./ A 14a. ábrán feltüntetett stratégiának megfelelően a ptacSDT plazmidot a BamHI és SpeI restrikciós endonukleázokkal hasítjuk és borjábólból nyert alkálikus foszfatással /Boehringer Mannheim/ defoszforilessük. A D21, D22, D23 és D21a, D22a, D23a oligonukleotidokat T4-polinukleotidkinázzal /Boehringer Mannheim/ 5'-terminálisan foszforiláljuk, egymással hibridizáljuk és az előkészített ptacSDT/Bam HI x Spe I fragmenssel ligáljuk. Ennek során az oligonukleotidot és a fragmenst 10:1 molarányban alkalmazzuk. A ligációs terméket használjuk fel kompetens E.coli-JM 103-sejtek transzformálásához. Ampicillin-táptalajon végzett szelekció után a 189 bp-Bam HI- SpeI-DNS-fragmenst tartalmazó, helyesen rekombinált plazmidokat magukban foglaló klónokat a DNS restrikciós analízisével azonosítjuk.

b./ Az ily módon nyert, "pALP 22" jelű plazmid külső terméket ezután az Hde I és Bam HI restrikciós endonukleázokkal hasítjuk és alkálikus foszfatással kezeljük. A D11, D12, D13 és D11a, D12a, D13a oligonukleotidokat T4-polinukleotid kinázzal 5'-terminálisan foszforiláljuk, egymással hibridizáljuk és a pALP 22/Bam HI x Hde I fragmenssel és T4-DNS-ligázzal történő ligáláshoz alkalmazzuk. A kompetens E. coli-JM 103-sejtek transzformálása és ampicillin-táptalajon végzett szelekció után a helyesen rekombinált plazmidokat - ezek egy 148 bp Hde I- Bam HI- illetve egy 337 bp Hde I-

Spe I-DNS-fragmenst tartalmaznak - restrikciós analízissel azonosítjuk. Az ily módon kapott plazmidot "pALP 23"-nak jelöljük. Az újonnan klónozott ALP 230 DNS-szekvencia - lásd 2a. ábra - verifikálását a 189 bp-Bam HI-Spe I-DNS-fragmens illetve a 167 bp-Xba I-Bam HI-DNS-fragmensnek pALP 23 plazmidból M13 mp18 és M13mp19/Xba I x Bam HI-ba történő szubklónozása után, standard primerrel /a Boehringer Mannheim cég Primer M13 "szekvenciakialakító terméke"/ végzett dideoxi-szekvencia-kialakítással [Sanger és tsai Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463, /1977/] végessük el.

2. példa

A 14b. ábrán feltüntetett stratégiának megfelelően a pALP 24 plazmidot alakítjuk ki. E célból az lb. példa szerint kapott pALP 23 plazmidot Stu I és Spe I restrikciós endonukleázokkal hasítjuk, majd defoszforilessük. A D24, D25, D24a és D25a oligonukleotidokat T4-polinukleotid-kinázzal 5'-terminálisan foszforilessük, majd egymással hibrid illesztjük és a ligálásához a pALP 23/Stu I x Spe I fragmenssel 10:1 molarányban használjuk fel. A ligációs termékeket alkalmassuk kompetens *E. coli*-JM 103-sejtek transzformálásához. Ampicillin-táptalajon végzett szelektálás után a helyesen rekombinált pALP 24 plazmidot azonosítjuk oly módon, hogy 189bp-Bam HI-Spe I-fragmensét az lb. példában leírt módon M13mp18-ba és M13mp19-be szubklónozzuk és szekvencirozzuk. Az ily módon szintetizált DNS "Alp 240" szekvencia - azaz az ALP 240-gén - kópletét a 2b. ábrán tüntetjük fel.

3. példa

a./ A pALP 23 vektor felhasználásával az "ALP 231" fehérjét [olyan /I/ általános képletű vegyület, amelyben W jelentése tirozin, X₁, X₂, X₃ és Z jelentése leucin és Y jelentése prolin] kódoló ALP 231-gént /lásd 3. ábra/ szintetizáljuk. E célból a pALP 23 kifejeső vektort a BstE II és Stu I restrikciós endonukleázzal hasítjuk, majd defoszforilezzük. Az M1 és M2 oligonukleotidokat /lásd 14. oldal/ az 1. példában ismertetett eljárással analóg módon a pALP 23/Bst E II x Stu I fragmensbe klónozva a pALP 231 plazmidhoz jutunk, amely az ALP 231-gént a kiindulási ptaoSDT plazmid Nde I és Spe I hasítási helyei között hordozza.

b./ Az M3 és M4 oligonukleotidokat /lásd 14. oldal/ a 3a. példa szerint előállított pALP 23/Bst E II x Stu I fragmensbe klónozva a pALP 232 plazmidhoz illetve az ALP 232-génhez jutunk, amely a "ALP 232" fehérjét - azaz olyan /I/ általános képletű vegyületet, amelyben W jelentése tirozin, X₁, X₂ és X₃ jelentése leucin, Y jelentése prolin és Z jelentése isoleucin /lásd 4. ábra/ - kódolja.

c./ A 3b./ példában leírt módon járunk el, azonban a megnevezett fragmensbe az M5 és M6 oligonukleotidokat /lásd 14. oldal/ kódoljuk. Az ily módon kapott pALP 236 plazmid illetve ALP 236-gén az "ALP 236" inhibitor fehérjét kódolja; ez olyan /I/ általános képletű vegyület, amelyben W jelentése glutaminsav, X₁, X₂, X₃ és Z jelentése leucin és Y jelentése prolin /lásd 5. ábra/.

4. példa

As "ALP 237" fehérjét \square W helyén tirozint, X_1 , X_2 és Z helyén leucint, X_3 helyén fenil-alanint és Y helyén prolint tartalmazó /I/ általános képletű vegyület; lásd 6. ábra/ kódoló ALP 237-gént a 3a./ példa szerint nyert pALP 231 plazmid felhasználásával a következőképpen építjük fel: a pALP 231 expressziós plazmidot Sac I és Spe I restrikciós endonukleázokkal hasítjuk, majd defoszforilezzük. Az 1. példában ismertetett eljárással analóg módon az E1, E2 és E3 oligonukleotidokat /lásd 15. oldal/ foszforilezzük, hibridizáljuk, majd az előkészített pALP 231/Sac I x Spe I fragmensevel ligáljuk. A pALP 237 klónozott termék az Nde I és Spe I hasítási helyek között tartalmazza az ALP 237-gént. Ennek szekvenciáját DNS szekvenálással igazoljuk.

5. példa

a./ A 3a. példa szerint járunk el az alábbi változtatással, hogy a pALP 23 vektor \square illetve pALP 23/Bst E II x Stu I fragmens \square helyett a 2. példa szerint kapott pALP 24 vektort \square illetve ennek pALP 24/Bst E II x Stu I defoszforilezett hasítási termékét \square alkalmazzuk és ebbe az M1 és M2 oligonukleotidokat klónozzuk. Ily módon a pALP 242 plazmidot illetve az "ALP 242" fehérjét \square W helyén tirozint, X_1 , X_2 és X_3 helyén metionint, Y helyén prolint és Z helyén leucint tartalmazó /I/ általános képletű vegyület \square kódoló ALP 242-gént /lásd 7. ábra/ kapjuk.

b./ Az 5a. példában leírtakkal analóg módon járunk el, azonban a pALP 24/Bst E II x Stu I fragmensbe az M5 és M6 oligonukleotidokat /lásd 14. oldal / kódoljuk. Ily módon a pALP 246 plazmidot illetve az ALP 246 inhibitor fehérjét \square W helyén

glutaminsavat, X₁, X₂ és X₃ helyén metionint, Y helyén prolint és Z helyén leucint tartalmazó /I/ általános képletű vegyület, lásd 8. ábra⁷ kódoló ALP 246-gént kapjuk.

6. példa

Találmányunk előnyös kiviteli alakja szerint a megfelelő géneket a tac-promotor mögött kétszeresen hordozó expressziós plazmidokat építünk fel és használunk fel /I/ általános képletű vegyületek nagyobb kitermeléssel történő kifejezéséhez.

a./ A 15. ábrán vázlatosan bemutatott pALP 2312 plazmid felépítéséhez a 3a. ábra szerint előállított pALP 231 expressziós plazmidból indulunk ki, amelyet Pst I és Spe I restrikciós endonukleázokkal hasítunk. Az ampicillin rezisztens gén elejét, a tac-promotort, a Shine-Dalgarno-szekvenciát és ^{az}ALP 231-gént hordozó fragmenst preparatív gél-elektroferézissel, majd azt követő gél-elválással izoláljuk.

Második kísérletben a pALP 231 plazmidot a Pst I és Xba I restrikciós endonukleázzal hasítjuk, borsjábólból nyert alkálikus foszfátással 5'-terminálisan defoszforilezzük és az előzetesen izolált Pst I-Spe I-fragmennel és ^aT4-DNS ligáz enzimrel együtt ligáljuk. A transzformálást kompetens *E. coli* JM 103-sejtekkel végessük el. A szelekción ampicillintartalmú táptalajon hajtjuk végre. Az egymás mögött két ALP-31-gént tartalmazó klónokat restrikciós analízissel azonosítjuk. Mindkét gén 5'-terminálisan 7 nukleotid távolságban azonos Shine-Dalgarno-szekvenciát hordoz. Az első gén mindkét stop-kodonját 16 nukleotid távolságban a második Shine-Dalgarno-szekvencia követi, majd ismét 7 nukleotid távolságban a második gén

következik. Ezt az új expressziós plazmidot pALP 2312-nek jelöljük.

b./ A 3b. példa szerint előállított pALP 232 plazmidból kiindulva a 6a. példában leírt módon az ALP 232-gént kétszeresen tartalmazó pALP 2322 expressziós plazmidot kapjuk.

c./ A 6a. és 6b. példában ismertetett eljárással analóg módon a pALP 23 /1b. példa/, pALP 24 /2. példa/, pALP 236 /3c. példa/, pALP 237 /4. példa/ illetve pALP 242 /5a. példa/ illetve pALP 246 /5b. példa/ plazmidokból indulunk ki és az ALP 230, ALP 240, ALP 236, ALP 237, ALP 242 illetve ALP 246 géneket kétszeresen tartalmazó pALP 2302, pALP 2402, pALP 2362, pALP 2372, pALP 2422 illetve pALP 2462 expressziós plazmidokat kapjuk.

7. példa

a./ Az *E. coli* K12 JM 103 /ATCC 39403/ törzs kompetens sejtjeit a 6a. példa szerint előállított pALP 2312 plazmiddal transformáljuk. Az ily módon nyert *E. coli* K12 JM 103 pALP 2312 törzset 1 l SM-táptalajban $\left[\begin{array}{l} 5 \text{ g/l ammónium-szulfát,} \\ 6 \text{ g/l dikálium-hidrogén-foszfát,} \\ 3 \text{ g/l nátrium-dihidrogén-} \\ \text{foszfát,} \\ 10 \text{ g/l élesztőextrakt,} \\ 0,25 \text{ g/l magnézium-szulfát,} \\ 10 \text{ g/l glükóz} \end{array} \right]$ ampicillin selekciós nyomás alatt $\left[\begin{array}{l} 100 \text{ mg/l} \end{array} \right]$ 22 °C-on Biotat M-fermenterban /Braun cég, Melsungen/ tenyésztjük. Az expressziós fázist 5 optikai sűrűség mellett /578 nm mellett mérve/ 75 mg/l isopropil-tio- β -D-galaktopiranosid hosszánásával vezetjük be. Az expressziós fázis alatt a táptalajt 5-5 g élesztőextraktum egy óras időközönként történő négyszeri hosszánásával kiegészítjük. Az indukció megkezdése után 5 órával az *E. coli* sejteket centrifugálással

leeratjuk. Az expresszió kitermelés az E. coli szuszpenziójára vonatkoztatva kb. 3 % inhibitor-fehérje.

b./ Az ALP 231 inhibitor-fehérje izolálása, visszahajtogatása /"refolding"/ és tisztítása céljából a sejttöredéket /kb. 25 g/ 350 ml, 50 mM Tris-HCl-t /pH 7,5/, 5 mM EDTA-t és 5 mM DTT-t tartalmazó elegyben szuszpendáljuk és nagynyomású homogenizátoron történő kétszeres átvenetéssel feltárjuk. Az eldhatatlan komponensek elválasztása céljából 20 percen át, 15 000 g mellett 4 °C-on centrifugáljuk. Az ALP 231 fehérje kb. 80-90 %-a az eldható frakcióban /felül/ helyezkedik el. Az enzimatikusan aktív formára történő visszahajtogatás bevezetése céljából a felülússót 20 mM DTT-értékre állítjuk be, 1 órán át 4 °C-on inkubáljuk és 50 ml térfogatú SP-Sephadex-G25 /Pharmacia Fine Chemicals, Inc./ ágyon kromatografáljuk. A Sephadexet előzetesen 50 mM Tris-HCl-t /pH 7,5/, 5 mM EDTA-t és 20 mM DDT-t tartalmazó eleggyel egyensúlyba hoztuk. Az oszlop anyagát 3 oszleptérfogatnyi 50 mM Tris-HCl-el /pH 7,5/ 5 mM EDTA-val, 5 mM DTT-vel, 2 oszleptérfogatnyi 50 mM Tris-HCl-el /pH 7,5/, 1 mM EDTA-val, 5 mM DTT-vel, 130 mM NaCl-el mossuk, majd az ALP 231 fehérjét két oszleptérfogatnyi, 50 mM Tris-HCl-t /pH 7,5/, 1 mM EDTA-t, 5 mM DTT-t és 300 mM NaCl-t tartalmazó eleggyel eluáljuk. Az ALP 231 oldatot 3,5 M guanidinium-hidroklorid értékre állítjuk be, 1 órán át 22 °C-on inkubáljuk, 1:7 arányban 100 mM Tris-HCl-el /pH 9/ higitjuk, 3 mM cisztein értékre állítjuk be és 6 órán át 22 °C-on inkubáljuk. A SP-Sephadex-G25-oszlopon végzett újabb kromatografálás céljából a reakcióelegyet 50 mM Tris-HCl-el /pH 7,5/ 1:4 arányban higitjuk, sósavval pH 7,5 értékre titráljuk és 10 ml oszlopanyagon [est előzetesen 50 mM Tris-HCl-el

/pH 7,5/ és 125 mM NaCl-al egyensúlyba hozzuk kromatografáljuk. Az oszlop anyagát 5 oszloptérfeogatnyi 50 mM Tris-HCl-el /pH 7,5/, 125 mM NaCl-el mossuk és 2 oszloptérfeogatnyi, 50 mM Tris-HCl-t /pH 7,5/ és 500 mM NaCl-t tartalmazó eleggyel eludljuk. A fehérjefrakciót - adott esetben fordított fázisú HPLC segítségével végzett finontisztítás után ^β₄₋₃₅.oldal/ - 50 mM Tris-HCl-el /pH-7,5/ szemben egy éjjelen át 4 °C-on dializáljuk.

As ALP 231 koncentrációját kétszeres "Sandwich-ELISA" segítségével határozzuk meg [Kramps és tsai: Am. Rev. Respir. Dis. 129, 959-963, /1984/].

Alternatív módon as ALP 231 /valamint a többi /I/ általános képletű fehérje/ koncentrációja pl. kvantitatív aminosav-analízis segítségével is meghatározható.

A kapott "ALP 231" [/I/ általános képletű vegyület] homogenitását és aszenességét N-terminális szekvencia-analízissel valamint as aminosavösszetétel meghatározásával igazoljuk. A termék HLE-vel és kimotripsinnel szemben kifejtett gátló aktivitását valamint oxidációval szemben mutatott fokozott stabilitását pl. a 9-12. ábrán mutatjuk be.

8. példa

A C-terminális ALP-231-tartományok lehasítása céljából a 7b.példa szerint izolált, 107 aminosavat tartalmazó /I/ általános képletű fehérjét /W jelentése tirozin, X₁, X₂ és X₃ és Z jelentése leucin és Y jelentése prolin/ 70 %-es hangyasavban oldjuk. A jelenlevő savérzékeny asparaginsav-prolin-kötés miatt [lásd /I/ általános képlet, 49-50 helyzet] szobahőmér-

sékleten 24-36 órán át végzett reagáltatás után a C-terminális ALP 231-tartományok legalább 20 %-a lebomol. Ezt az intakt tartományt savas kezelés után HPLC segítségével elválaszthatjuk és tisztíthatjuk. Az aminosav-szekvencia a teljes ALP 231 fehérje 50-107 helyzetével azonos:

Pre-Val-Asp-Thr-Pro-Asn-Pro-Thr-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Lys-Cys-
Pre-Val-Thr-Tyr-Gly-Gln-Cys-Leu-Leu-Leu-Asn-Pro-Pro-Asn-Phe-
Cys-Glu-Leu-Asp-Gly-Gln-Cys-Lys-Arg-Asp-Leu-Lys-Cys-Cys-Leu-
Gly-Leu-Cys-Gly-Lys-Ser-Cys-Val-Ser-Pro-Val-Lys-Ala

Az alábbi táblázatban a deponált mikroorganizmusokat foglaljuk össze:

Mikroorganizmus	Deponálási hely	Deponálási szám
pBR 322	ATCC	31 344
ptaesDT /E.coli K12 JM 103-ban/	DSM	5 018
E.coli K12 JM 101	ATCC	33 876
E.coli K12 JM 103	ATCC	39 403
E.coli K12 JM 105	DSM	4 162
E.coli K12 DH 1	ATCC	33 849

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás /I/ általános képletű új szerinproteáz-inhibitor-fehérjéket vagy legalább az 53-101 helyzetekben levő szekvenciákat tartalmazó részrészleteiket /mely képletben W jelentése tirozin vagy glutaminsav, X_1 és X_2 azonos vagy különböző lehet és mindkét maradék metionint vagy leucint képvisel, X_3 jelentése metionin, leucin vagy fenil-alanin, Y jelentése prolin vagy arginin és Z jelentése leucin vagy - amennyiben W tirozint és X_1 , X_2 és X_3 leucint képvisel - úgy isoleucin is lehet/ vagy a fenti új szerinproteáz-inhibitor fehérjék fűzés fehérjéit kódoló új DNS-szekvenciák szintézisére, a s s a l j e l l e m e s v e, hogy a ptaoSDT /DSM 5018/ plazmidból kiindulva, önmagában ismert módon az 1b. ábra szerinti D21-D23a oligonukleotidok felhasználásával és egy további lépésben az 1a. ábra szerinti D11-D13a oligonukleotidok alkalmazásával a 2a ábrán feltüntetett DNS-szekvenciát tartalmazó pALP 23 plazmidot építjük fel; ezt a plazmidot adott esetben az 1c. ábra szerinti D24-D25a oligonukleotidok felhasználásával a 2b. ábrán feltüntetett DNS-szekvenciát tartalmazó pALP 24 plazmid felépítéséhez használjuk fel; adott esetben az ily módon kapott pALP 23 vagy pALP 24 plazmidba párenként olyan oligonukleotidokat klónozzunk, hogy a keletkező plazmidok X_3 helyén metionint vagy leucint tartalmazó /I/ általános képletű fehérjéket /ahol W, X_1 , X_2 , Y és Z jelentése a fent megadott/ kódoló DNS-szekvenciákat tartalmazzanak és adott esetben ezeket további oligonukleotidok segítségével oly módon módosítjuk, hogy X_3 helyén fenilalanint tartalmazó /I/ általános képletű fehérjét

/mely képletben W, X₁, X₂, Y és Z jelentése a fent megadott/
kódoló DNS-szekvenciákat tartalmazsának.

/Elsőbbsége: 1989. 11. 22./

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a s s a l j e l l e m e s v e, hogy a pALP 23 plazmidba vagy pALP 24 plazmidba páronként M1 és M2, M3 és M4 vagy M5 és M6 képletű oligonukleotidokat klónozzunk és ily módon X₃ helyén metionint vagy leucint tartalmazó /I/ általános képletű vegyületeket /ahol W, X₁, X₂, Y és Z jelentése a fent megadott/ kódoló DNS-szekvenciákat állítunk elő. /Elsőbbsége: 1989. 11. 22./

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, a s s a l j e l l e m e s v e, hogy /Ia/ általános képletű szerinproteáz-inhibitor-fehérjét vagy legalább az 53-101 helyzetekben levő szekvenciát tartalmazó részstartományait /mely képletben X₁, X₂, Y és Z jelentése az 1. igénypontban megadott és X₃ jelentése metionin vagy leucin/ kódoló DNS-szekvencia szintézise esetén, a pALP 23 vagy pALP 24 plazmidba páronként az M1 és M2 vagy M3 és M4 oligonukleotidokat klónozzuk.
/Elsőbbsége: 1988. 12. 13./

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a s s a l j e l l e m e s v e, hogy X₃ helyén fenil-alanint tartalmazó /I/ általános képletű vegyületet kódoló DNS-szekvencia előállításán esetén, valamely a 2. vagy 3. igénypont szerint kapott DNS-szekvenciába olyan oligonukleotidokat klónozzunk, amelyek az /I/ általános képlet 96-helyzetében fenil-alanin kifejezését idézik elő. /Elsőbbsége: 1989.11.22./

5. Az 1., 2. és 4. igénypontok szerinti eljárás, a s s a l j e l l e m e s v e, hogy X₁ és X₂ helyén leucint

és I_3 helyén fenil-alanint tartalmazó /I/ általános képletű vegyületet /mely képletben W, Y és Z jelentése a fent megadott/ kódoló DNS-szekvencia előállításánál, a pALP 23 plazmidba az M1 és M2, M3 és M4 vagy M5 és M6 oligonukleotidokat páronként klónozzuk, a kapott plazmidot a Sac I és Spe I restriktációs endonukleázokkal hasítjuk, majd szokásos módon defoszforilezzük és az ily módon kapott fragmensbe az /E1/, /E2/ és /E3/ képletű /foszforilezett/ oligonukleotidok hibridizációs termékét ligáljuk. /Elsőbbsége: 1989. 11. 22./

6. Eljárás a 6. ábrán feltüntetett, az ALP 237 szerin-proteáz-inhibitor-fehérjét kódoló újDNS-szekvencia előállítására, a s z a l j e l l e m e z v e, hogy az M1 és M2 oligonukleotidoknak a pALP 23 plazmidba történő klónozásával kapott pALP 231 plazmidot a Sac I és Spe I restriktációs endonukleázokkal hasítjuk, majd szokásos módon defoszforilezzük és az ily módon kapott pALP 231/Sac I x Spe I fragmensbe az /E1/, /E2/ és /E3/ képletű /foszforilezett/ oligonukleotidok hibridizációs termékét ligáljuk. /Elsőbbsége: 1989. 11. 22./

7. Eljárás /I/ általános képletű vegyületek kifejezésére alkalmas rekombináns vektor előállítására, a s z a l j e l l e m e z v e, hogy valamely, az 1-6. igénypontek bármelyike szerinti eljárással előállított DNS-szekvenciát egy vektor-molekulába oly módon illesztünk be, hogy egy expresszió-kontroll-szekvenciával - előnyösen egy tac-promoterral kezdődő és egy terminátor-szekvenciával végződő kifejező kontroll szekvenciával - funkcionálisan kapcsolódják. /Elsőbbsége: 1989. 11. 22./

8. Eljárás /Ia/ általános képletű vegyületek kifejezésére alkalmas rekombináns vektor előállítására, a z s a l j e l l e m e s v e, hogy a 3. igénypont szerinti eljárással előállított DNS-szekvenciát egy vektor-molekulába oly módon illesztünk be, hogy egy expresszió-kontroll-szekvenciával - előnyösen egy tac-promoterral kezdődő és egy terminátor-szekvenciával végződő kifejező kontroll szekvenciával - funkcionálisan kapcsolódják. /Elsőbbsége: 1988. 12. 13./

9. Eljárás /I/ általános képletű vegyületek kifejezésére alkalmas rekombináns vektor előállítására, a z s a l j e l l e m e s v e, hogy a 7. igénypont szerint kapott expressziós vektort önmagában ismert módon részmenyiségekben restrikciós endonukleázok különböző párjaival hasítjuk, a kapott fragmensek valamelyikét adott esetben defoszforilezzük, majd az olyan expressziós vektorhoz vezető fragmenseket ligáljuk, amely expressziós vektor az /I/ általános képletű vegyületeket kódoló DNS-szekvenciát a tac-promotor mögött kétszeresen - két stop-kodon, egy kb. 16 nukleotidot tartalmazó szekvencia, egy Shine-Dalgarno-szekvencia és egy további kb. 7 nukleotidot tartalmazó szekvencia által elválasztva - tartalmazza. /Elsőbbsége: 1989. 11. 22./

10. Eljárás /Ia/ általános képletű vegyületek kifejezésére alkalmas rekombináns vektor előállítására, a z s a l j e l l e m e s v e, hogy a 8. igénypont szerint kapott expressziós vektort önmagában ismert módon részmenyiségekben restrikciós endonukleázok különböző párjaival hasítjuk, a kapott fragmensek valamelyikét adott esetben defoszforilezzük, majd az olyan expressziós vektorhoz vezető fragmenseket ligáljuk, amely expressziós vektor az /Ia/ általános képletű

vegyületeket kódoló DNS-szekvenciát a tac-promotor mögött két-szeresen - két stop-kodon, egy kb. 16 nukleotidot tartalmazó szekvencia, egy Shine-Dalgarno-szekvencia és egy további kb. 7 nukleotidot tartalmazó szekvencia által elválasztva - tartalmazza. /Elsőbbsége: 1988. 12. 13./

11. A 9. igénypont szerinti eljárás /I/ általános képletű vegyületek kifejezésére alkalmas rekombináns vektor előállítására, a z s a l j e l l e m e s v e, hogy a 7. igénypont szerint előállított expressziós vektor egy részmennyiségét a Pst I és Spe I restriktációs endonukleázokkal, a vektor másik részmennyiségét a Pst I és Xba I restriktációs endonukleázokkal hasítjuk és az ily módon kapott, az /I/ általános képletű vegyületet kódoló fragmenseket, adott esetben defoszforilezés után, ligáljuk. /Elsőbbsége: 1989. 11. 22./

12. A 10. igénypont szerinti eljárás /Ia/ általános képletű vegyületek kifejezésére alkalmas rekombináns vektor előállítására, a z s a l j e l l e m e s v e, hogy a 8. igénypont szerint előállított expressziós vektor egy részmennyiségét a Pst I és Spe I restriktációs endonukleázokkal, a vektor másik részmennyiségét a Pst I és Xba I restriktációs endonukleázokkal hasítjuk és az ily módon kapott, az /Ia/ általános képletű vegyületet kódoló fragmenseket, adott esetben defoszforilezés után, ligáljuk. /Elsőbbsége: 1988. 12. 13./

13. Eljárás valamely /I/ általános képletű szerinproteáz-inhibitor-fehérje vagy fúziós fehérjéje előállítására, a z s a l j e l l e m e s v e, hogy valamely gazdaszervezetet a 7., 9. és 11. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns vektorral transzformálunk, majd szokásos táptalajban

tenyésztünk, adott esetben a kívánt fehérje kifejezését indukáljuk, majd a képződő kifejezett terméket izoláljuk, redukálószerrel, majd azt követően oxidálószerrel történő kezeléssel újrarahajtogatásos /refolding/ eljárásnak vetjük alá, végül a kapott /I/ általános képletű biológiailag aktív szerinproteáz-inhibitor-fehérjét önmagában ismert módon izoláljuk és tisztítjuk. /Elsőbbsége: 1989. 11. 22./

14. Eljárás valamely /Ia/ általános képletű szerinproteáz-inhibitorfehérje vagy fúziós fehérjéje előállítására, a s s a l j e l l e m e s v e, hogy valamely gazdaszervezetet a 8., 10. vagy 12. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns vektorral transzformálunk, majd szokásos táptalajban tenyésztünk, adott esetben a kívánt fehérje kifejezését indukáljuk, majd a képződő kifejezett terméket izoláljuk, redukálószerrel majd azt követően oxidálószerrel történő kezeléssel újrarahajtogatásos /refolding/ eljárásnak vetjük alá, végül a kapott /I/ általános képletű biológiailag aktív szerinproteáz-inhibitorfehérjét önmagában ismert módon izoláljuk és tisztítjuk. /Elsőbbsége: 1988. 12. 13./

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, a s s a l j e l l e m e s v e, hogy gazdaszervezetként valamely baktériumot, előnyösen valamely *E. coli* vagy *B. subtilis* törzset, vagy valamely mikroszkópiusan kicsiny gombát, előnyösen valamely *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* vagy *Saccharomyces cerevisiae* törzset, vagy valamely állati vagy humán sejtet alkalmazunk. /Elsőbbsége: 1989. 11. 22./

16. A 14. és 15. igénypont szerinti eljárás, a s s a l j e l l e m e s v e, hogy gazdaszervezetként valamely *E. coli*

türsset - előnyösen a K12 alcsoportba tartozó türsset - alkalmazunk. /Elsőbbsége: 1989. 11. 22./

17. A 14., 15. és 16. igénypont szerinti eljárás, a s s a l j e l l e m e s v e, hogy gazdaszervezetként valamely alábbi türsset alkalmazunk: E. coli K12 JM 101 /ATCC 33876/, E. coli K12 JM 103 /ATCC 39403/, E. coli K12 JM 105 /DSM 4162/ és E. coli K12 DH1 /ATCC 33849/.

/Elsőbbsége: 1989. 11. 22./

18. A 13. igénypont szerinti eljárás az /I/ általános képletű aminosav-szekvencia részstartományait magábanfoglaló szerinproteáz-inhibitorfehérje előállítására, a s s a l j e l l e m e s v e, hogy a 13. igénypont szerinti eljárásnál képződő expressziós terméket a fermentléből izoláljuk, majd szabályozott savas hidrolizissal a 49-50 helyzetekben levő aszparaginsav-prolin-kötést felhasítjuk és/vagy szabályozott enzimes hasítással a 107-102 helyzetekben levő összes aminosavat vagy ezek közül csak egy-öt aminosavat lehasítunk és az ily módon kapott hidrolizis terméket a hidrolizátumból kinyerjük. /Elsőbbsége: 1989. 11. 22./

19. A 14. igénypont szerinti eljárás az /Ia/ általános képletű aminosav-szekvencia részstartományait magábanfoglaló szerinproteáz-inhibitorfehérje előállítására, a s s a l j e l l e m e s v e, hogy a 14. igénypont szerinti eljárásnál képződő expressziós terméket a fermentléből izoláljuk, majd szabályozott savas hidrolizissal a 49-50 helyzetekben levő aszparaginsav-prolin-kötést felhasítjuk és/vagy szabályozott enzimes hasítással a 107-102 helyzetekben levő összes aminosavat vagy ezek közül csak egy-öt aminosavat lehasítunk és az ily módon kapott hidrolizis terméket a hidrolizátumból kinyerjük. /Elsőbbsége: 1988. 12. 13./

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, a z s a l j e l l e m e s v e, hogy a 3. ábrán feltüntetett ALP 231 szerinproteáz-inhibitor-fehérjéből az 1-49. helyzetekben levő aminosavakat savas hidrolízissel - előnyösen 70 %-os hangyasavval - elválasztjuk és ily módon /II/ képletű aminosav-szekvenciát tartalmazó új szerinproteáz-inhibitor-fehérjét kapunk. /Elsőbbsége: 1988. 12. 13./

21. Eljárás az /I/ általános képletű aminosav-szekvenciának legalább az 53-101 helyzeteiben levő részstartományait tartalmazó új szerinproteáz-inhibitor-fehérje előállítására /ahol X_1 és X_2 jelentése leucin és X_3 jelentése leucin vagy fenil-alanin/, a z s a l j e l l e m e s v e, hogy az inhibitor-fehérjét kódoló DNS-szekvenciába 5'-terminálisan az ATG kodont beillesztjük, majd a kifejezésnél képsődő, az előállítandó termék N-végcsoportja előtt további metionin aminosavat tartalmazó termékben a metionin és a kívánt inhibitor-fehérje N-terminális aminosava közötti kötést szokásos módon - előnyösen bróm-oiánnal - hasítjuk. /Elsőbbsége: 1989. 11. 22./

22. Eljárás az /Ia/ általános képletű aminosav-szekvenciának legalább 53-101 helyzeteiben levő részstartományait tartalmazó új szerinproteáz-inhibitor-fehérje előállítására /ahol X_1 , X_2 és X_3 jelentése leucin/, a z s a l j e l l e m e s v e, hogy az inhibitor-fehérjét kódoló DNS-szekvenciába 5'-terminálisan az ATG kodont beillesztjük, majd a kifejezésnél képsődő, az előállítandó termék N-végcsoportja előtt további metionin aminosavat tartalmazó termékben a metionin és a kívánt inhibitor-fehérje N-terminális aminosava közötti kötést szokásos módon - előnyösen bróm-oiánnal - hasítjuk. /Elsőbbsége: 1988. 12. 13./

23. Eljárás gyógyászati készítmények előállítására, a s z a l j e l l e m e s v e, hogy a 13., 18. vagy 21. igénypont szerinti eljárással előállított szerinproteáz-inhibitor-fehérjét mint hatóanyagot a gyógyszergyártás ünnagukban ismert módszereivel szokásos gyógyászati hordozóanyagokkal és/vagy higitóanyagokkal és/vagy segédanyagokkal összekeverve parenterálisan vagy helyileg felhasználható gyógyászati készítménnyé alakítjuk. /Elsőbbsége: 1989. 11. 22./

24. Eljárás gyógyászati készítmények előállítására, a s z a l j e l l e m e s v e, hogy valamely, a 14., 15.-17., 19., 20. vagy 22. igénypont szerinti eljárással előállított szerinproteáz-inhibitor-fehérjét mint hatóanyagot a gyógyszergyártás ünnagukban ismert módszereivel szokásos gyógyászati hordozóanyagokkal és/vagy higitóanyagokkal és/vagy segédanyagokkal összekeverve parenterálisan vagy helyileg felhasználható gyógyászati készítménnyé alakítjuk. /Elsőbbsége: 1988. 12. 13./

25. Eljárás gyógyászati készítmények előállítására, a s z a l j e l l e m e s v e, hogy valamely /I/ általános képletű szerinproteáz-inhibitor-fehérjét vagy annak legalább az 53-101 helyzetekben levő szekvenciáit magábanfoglaló rész-tartományát szokásos gyógyászati hordozóanyagokkal összekeverünk és ily módon véralvadásszavarek, tumorek elburjánzó növekedése, emphisémiák, artritis, vesegyulladás, és különösen politraumatikus vagy szeptikus sokk vagy pankreatitis esetében fellépő excessziv gyulladások vagy a szerinproteázok és szerinproteáz-inhibitorok közötti egyensúly felbomlásával összefüggő más betegségek kezelésére és/vagy megelőzésére fel-

használható gyógyászati készítménnyé alakítjuk.

/Elsőbbsége: 1989. 11. 22./

26. Eljárás gyógyászati készítmények előállítására,
a s s a l j e l l e m e s v e, hogy valamely /I./ általános
képletű szerinproteáz-inhibitor-fehőxjét vagy annak legalább
az 53-101 helyzetekben levő szekvenciát magábanfoglaló rész-
tartományát szokásos gyógyászati hordozóanyagokkal összekeve-
rünk és ily módon vérrelvadásszavarak, tumorerburjánzó növe-
kedése, emfizemiák, artritis, vesegyulladás, és különösen
politraumatikus vagy szeptikus sokk vagy pankreatitis esetében
fellépő excesszív gyulladások vagy a szerinproteázok és szerin-
proteáz-inhibitorok közötti egyensúly felbomlásával összefüggő
más betegségek kezelésére és/vagy megelőzésére felhasznál-
ható gyógyászati készítménnyé alakítjuk.

/Elsőbbsége: 1988. 12. 13./

**A bejelentő helyett
a meghatalmasott:**

54 oldal
19 ábracsoport

43

Budapesti 14. sz. Ügyvédi Munkaközösség
1370 Budapest, Engels tér 2.
Telefon: 172-199, 172-193
Ügyvezető:
Dr. JALSCVSZKY GYÖRGYNE
Ügyvéd

[Handwritten signature]

6124/89

000000/90

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

1/19

1a. ábra

-54208-

Oligonukleotid : D11

10 20 30 40 50
GTCTAAAGAA TCCTCCTGTC TCGCGCCGAA ACTTTCTGAA TGGCGAGTAT

Oligonukleotid : D12

10 20 30 40 50 55
GGTCCTGTGA CGGTCAGTCT GACCGTGAGC CCAAAGAACA TTGCGTCCGT GACTC

Oligonukleotid : D13

10 20 30 40 43
GTCCGTAAAC TATGGTGTTC ACAGTCCTGT TGTGCGAAG AAT

Oligonukleotid : D11a

10 20 30 40 50 58
ACTCGCCATT CAGAAAGTTT CGGCCGCAGA CAGGAGGATT CTTTAGACGA GTCACGGA

Oligonukleotid : D12a

10 20 30 40 50 54
CGCAATGTTC TTTGGGCTCA CGGTCAGACT GACCGTCACA GGACCATTCT TCGC

Oligonukleotid : D13a

10 20 30 38
AACACAGGA CTGTGAACAC CATAGTTTAC GGACCTAG



2/19

lb. ábra

Oligonukleotid : D21

10 20 30 40 50 60
GGACAAGTCG TCGTCCGTGA CTGGCATCCA TTGGCCCGTG AAGGGCCCAA ATGCTGCGCA
70 80 84
GCCCAAGCCC CACAGTTGGC CTAG

Oligonukleotid : D22

10 20 30 40 50 60
CGTGTCTGGG TCCGTCGTAA AGTCTAGAGC AAACGTGACC GGTAGCTCGA GCGTCTTCAA
63
TCC

Oligonukleotid : D23

10 20 30 40
AACTAGGATA GTTCGGAATT GGCCCGATTG CGTCGAAAAT GG

Oligonukleotid : D21a

10 20 30 40 50 60
GCCAACTGTG GGGCTTGGGC TCGGCAGCAT TTGGGCCCTT CACGGGCCAA TGGATGCCAG
65
TCACG

Oligonukleotid : D22a

10 20 30 40 50 60
GACGACGACT TGTCCGGATT GAAGACGCTC GAGCTACCGG TCACGTTTGC TCTAGACTTT
63
ACG

Oligonukleotid : D23a

10 20 30 40 50 60
ACGGACCCAG ACACGCCATT TTCGACGCAA TCGGGCCAAT TCCGAACTAT CCTAGTTGAT C

Budapesti 14. sz. Könyvtár Munkácsy Mihály utca 2.
1370 Budapest, V. ker. 14. sz. 2.
Telefon: 463 11 11
Dr. János ...

3/19

lc. ábra

Oligonukleotid : D24

10 20 30 40 50 60
 CGTGTATGGG TACGTCGTAA AGTCTAGAGC AAACGTGACC GGTAGGTAGA GCGTCTTCAA
 63
 TCC

Oligonukleotid : D25

10 20 30 40
 AACTAGGATA GTTCGGAATT GGCCCGATTG CGTCGAAAAT GG

Oligonukleotid : D24a

10 20 30 40 48
 GGATTGAAGA CGCTCTACCT ACCGGTCACG TTTGCTCTAG ACTTTACG

Oligonukleotid : D25a

10 20 30 40 50 60
 ACCTACCCAT ACACGCCATT TTCGACGCAA TCGGGCCAAT TCCGAACTAT CCTAGTTGAT C

2a. ábra

ALP 230 gén

60
 AGCGGTAAGT CTTTCAAAGC CGGCGTCTGT CCTCCTAAGA AATCTGCTCA GTGCCTGCGT
 120
 TACAAGAAAC CCGAGTGCCA GTCTGACTGG CAGTGTCTTG GTAAGAAGCG TTGTTGTCCT
 180
 GACACTTGTG GTATCAAATG CCTGGATCCG GTTGACACCC CGAACCCGAC GCGTCGTAAA
 240
 CCCGGGAAGT GCCCGGTTAC CTACGGTCAG TGCCTGCTGC TGAACAGGCC TAACTTCTGC
 300
 GAGCTCGATG GCCAGTGCAA ACGAGATCTG AAATGCTGCC TGGGTCTGTG CGGTAAAAGC
 TCGGTTAGCC CGGTTAAGGC T

ALP 230

18
 Ser-Gly-Lys-Ser-Phe-Lys-Ala-Gly-Val-Cys-Pro-Pro-Lys-Lys-Ser-Ala-Gln-Cys-
 36
 Leu-Arg-Tyr-Lys-Lys-Pro-Glu-Cys-Gln-Ser-Asp-Trp-Gln-Cys-Pro-Gly-Lys-Lys-
 54
 Arg-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Cys-Gly-Ile-Lys-Cys-Leu-Asp-Pro-Val-Asp-Thr-Pro-
 72
 Asn-Pro-Thr-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Lys-Cys-Pro-Val-Thr-Tyr-Gly-Gln-Cys-Leu-
 90
 Leu-Leu-Asn-Arg-Pro-Asn-Phe-Cys-Glu-Leu-Asp-Gly-Gln-Cys-Lys-Arg-Asp-Leu-
 107
 Lys-Cys-Cys-Leu-Gly-Leu-Cys-Gly-Lys-Ser-Cys-Val-Ser-Pro-Val-Lys-Ala

Dr. JALSOVS
 Dr. JALSOVS
 Dr. JALSOVS
 Dr. JALSOVS

2b. ábra

ALP 240 gén

AGCGGTAAGT CTTTCAAAGC CGGCGTCTGT CCTCCTAAGA AATCTGCTCA GTGCCTGCGT 60
 TACAAGAAAC CCGAGTGCCA GTCTGACTGG CAGTGTCTCTG GTAAGAAGCG TTGTTGTCCT 120
 GACACTTGTG GTATCAAATG CCTGGATCCG GTTGACACCC CGAACCCGAC GCGTCGTAAA 180
 CCCGGGAAGT GCCCGGTTAC CTACGGTCAG TGCCTGCTGC TGAACAGGCC TAACTTCTGC 240
 GAGATGGATG GCCAGTGCAA ACGAGATCTG AAATGCTGCA TGGGTATGTG CCGTAAAAGC 300
 TCGGTTAGCC CGGTTAAGGC T

ALP 240

Ser-Gly-Lys-Ser-Phe-Lys-Ala-Gly-Val-Cys-Pro-Pro-Lys-Lys-Ser-Ala-Gln-Cys- 18
 Leu-Arg-Tyr-Lys-Lys-Pro-Glu-Cys-Gln-Ser-Asp-Trp-Gln-Cys-Pro-Gly-Lys-Lys- 36
 Arg-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Cys-Gly-Ile-Lys-Cys-Leu-Asp-Pro-Val-Asp-Thr-Pro- 54
 Asn-Pro-Thr-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Lys-Cys-Pro-Val-Thr-Tyr-Gly-Gln-Cys-Leu- 72
 Leu-Leu-Asn-Arg-Pro-Asn-Phe-Cys-Glu-Met-Asp-Gly-Gln-Cys-Lys-Arg-Asp-Leu- 90
 Lys-Cys-Cys-Met-Gly-Met-Cys-Gly-Lys-Ser-Cys-Val-Ser-Pro-Val-Lys-Ala 107

Budapesti 14. sz. Községi Munkaügyi Hivatal
 1370 Budaörs, Bencsik utca 2.
 Telefon 172-103 172-103
 Ügyintéző
 Dr. JALOSVÁRI GYÖRGYÉNÉ
 ügyvéd

6/19

3. ábra

ALP-231 gén

AGCGGTAAGT CTTTCAAAGC CGGCGTCTGT CCTCCTAAGA AATCTGCTCA GTGCCTGCGT 60
 TACAAGAAAC CCGAGTGCCA GTCTGACTGG CAGTGTCCCTG GTAAGAAGCG TTGTTGTCCT 120
 GACTTGTG GTATCAAATG CCTGGATCCG GTTGACACCC CGAACCCGAC GCGTCGTAAA 180
 CCCGGGAAGT GCCCGTTAC CTACGGTCAG TGCCTGCTGC TGAACCCGCC TAACTTCTGC 240
 GAGCTCGATG GCCAGTGCAA ACGAGATCTG AAATGCTGCC TGGGTCTGTG CGGTAAAAGC 300
 TCGGTTAGCC CGGTTAAGGC T

ALP 231

Ser-Gly-Lys-Ser-Phe-Lys-Ala-Gly-Val-Cys-Pro-Pro-Lys-Lys-Ser-Ala-Gln-Cys- 18
 Leu-Arg-Tyr-Lys-Lys-Pro-Glu-Cys-Gln-Ser-Asp-Trp-Gln-Cys-Pro-Gly-Lys-Lys- 36
 Arg-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Cys-Gly-Ile-Lys-Cys-Leu-Asp-Pro-Val-Asp-Thr-Pro- 54
 Asn-Pro-Thr-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Lys-Cys-Pro-Val-Thr-Tyr-Gly-Gln-Cys-Leu- 72
 Leu-Leu-Asn-Pro-Pro-Asn-Phe-Cys-Glu-Leu-Asp-Gly-Gln-Cys-Lys-Arg-Asp-Leu- 90
 Lys-Cys-Cys-Leu-Gly-Leu-Cys-Gly-Lys-Ser-Cys-Val-Ser-Pro-Val-Lys-Ala 107

Magyar Tudományos Akadémia
 Biológiai Kutatóközpontja
 Molekuláris Biológiai Intézet
 Budapest, Magyarországon
 2019. évi május 15. napján
 Dr. [Signature]
 Intézetvezető

4. ábra

ALP 232 gén

AGCGGTAAGT CTTTCAAAGC CGGCGTCTGT CCTCCTAAGA AATCTGCTCA GTGCCTGCGT 60
 TACAAGAAAC CCGAGTGCCA GTCTGACTGG CAGTGTCTTG GTAAGAAGCG TTGTTGTCTT 120
 GACACTTGTG GTATCAAATG CCTGGATCCG GTTGACACCC CGAACCCGAC GCGTCGTAAA 180
 CCCGGGAAGT GCCCGGTTAC CTACGGTCAG TGCATCCTGC TGAACCCGCC TAACTTCTGC 240
 GAGCTCGATG GCCAGTGCAA ACGAGATCTG AAATGCTGCC TGGGTCTGTG CCGTAAAAGC 300
 TCGGTTAGCC CGGTTAAGGC T

ALP 232

Ser-Gly-Lys-Ser-Phe-Lys-Ala-Gly-Val-Cys-Pro-Pro-Lys-Lys-Ser-Ala-Gln-Cys- 18
 Leu-Arg-Tyr-Lys-Lys-Pro-Glu-Cys-Gln-Ser-Asp-Trp-Gln-Cys-Pro-Gly-Lys-Lys- 36
 Arg-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Cys-Gly-Ile-Lys-Cys-Leu-Asp-Pro-Val-Asp-Thr-Pro- 54
 Asn-Pro-Thr-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Lys-Cys-Pro-Val-Thr-Tyr-Gly-Gln-Cys-Ile- 72
 Leu-Leu-Asn-Pro-Pro-Asn-Phe-Cys-Glu-Leu-Asp-Gly-Gln-Cys-Lys-Arg-Asp-Leu- 90
 Lys-Cys-Cys-Leu-Gly-Leu-Cys-Gly-Lys-Ser-Cys-Val-Ser-Pro-Val-Lys-Ala 107

8/19

5. ábra

ALP 236 gén

AGCGGTAAGT CTTTCAAAGC CGGCGTCTGT CCTCCTAAGA AATCTGCTCA GTGCCTGCGT 60
 TACAAGAAAC CCGAGTGCCA GTCTGACTGG CAGTGTCTCTG GTAAGAAGCG TTGTTGTCCT 120
 GACACTTGTG GTATCAAATG CCTGGATCCG GTTGACACCC CGAACCCGAC GCGTCGTAAA 180
 CCCGGGAAGT GCCCGGTTAC CGAAGGTCAG TGCCTGCTGC TGAACCCGCC TAACTTCTGC 240
 GAGCTCGATG GCCAGTGCAA ACGAGATCTG AAATGCTGCC TGGGTCTGTG CGGTAAAAGC 300
 TCGGTTAGCC CGGTTAAGGC T

ALP 236

Ser-Gly-Lys-Ser-Phe-Lys-Ala-Gly-Val-Cys-Pro-Pro-Lys-Lys-Ser-Ala-Gln-Cys- 18
 Leu-Arg-Tyr-Lys-Lys-Pro-Glu-Cys-Gln-Ser-Asp-Trp-Gln-Cys-Pro-Gly-Lys-Lys- 36
 Arg-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Cys-Gly-Ile-Lys-Cys-Leu-Asp-Pro-Val-Asp-Thr-Pro- 51
 Asn-Pro-Thr-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Lys-Cys-Pro-Val-Thr-Glu-Gly-Gln-Cys-Leu- 72
 Leu-Leu-Asn-Pro-Pro-Asn-Phe-Cys-Glu-Leu-Asp-Gly-Gln-Cys-Lys-Arg-Asp-Leu- 90
 Lys-Cys-Cys-Leu-Gly-Leu-Cys-Gly-Lys-Ser-Cys-Val-Ser-Pro-Val-Lys-Ala 107

9/19

6. ábra

ALP 237 gén

AGCGGTAAGT CTTTCAAAGC CGGCGTCTGT CCTCCTAAGA AATCTGCTCA GTGCCTGCGT 60
 TACAAGAAAC CCGAGTGCCA GTCTGACTGG CAGTGTCTCTG GTAAGAAGCG TTGTTGTCCT 120
 GACACTTGTG GTATCAAATG CCTGGATCCG GTTGACACCC CGAACCCGAC GCGTCGTAAA 180
 CCCGGGAAGT GCCCGGTTAC CTACGGTCAG TGCCTGCTGC TGAACCCGCC TAACTTCTGC 240
 GAGCTCGATG GCCAGTGCAA ACGAGATCTG AAATGCTGCC TGGGTTTCTG CCGTAAAAGC 300
 TCGGTTAGCC CGGTTAAGGC T

ALP 237

Ser-Gly-Lys-Ser-Phe-Lys-Ala-Gly-Val-Cys-Pro-Pro-Lys-Lys-Ser-Ala-Gln-Cys- 18
 Leu-Arg-Tyr-Lys-Lys-Pro-Glu-Cys-Gln-Ser-Asp-Trp-Gln-Cys-Pro-Gly-Lys-Lys- 36
 Arg-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Cys-Gly-Ile-Lys-Cys-Leu-Asp-Pro-Val-Asp-Thr-Pro- 54
 Asn-Pro-Thr-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Lys-Cys-Pro-Val-Thr-Tyr-Gly-Gln-Cys-Leu- 72
 Leu-Leu-Asn-Pro-Pro-Asn-Phe-Cys-Glu-Leu-Asp-Gly-Gln-Cys-Lys-Arg-Asp-Leu- 90
 Lys-Cys-Cys-Leu-Gly-Phe-Cys-Gly-Lys-Ser-Cys-Val-Ser-Pro-Val-Lys-Ala 107

10 / 19

ALP 242 gén

7. ábra

AGCGGTAAGT CTTTCAAAGC CGGCGTCTGT CCTCCTAAGA AATCTGCTCA GTGCCTGCGT 60
 TACAAGAAAC CCGAGTGCCA GTCTGACTGG CAGTGTCCCTG GTAAGAAGCG TTGTGTGCCT 120
 GACACTTGTG GTATCAAATG CCTGGATCCG GTTGACACCC CGAACCCGAC GCGTCGTAAA 180
 CCCGGGAAGT GCCCGGTTAC CTACGGTCAG TGCCTGCTGC TGAACCCGCC TAACTTCTGC 240
 GAGATGGATG GCCAGTGCAA ACGAGATCTG AAATGCTGCA TGGGTATGTG CCGTAAAAGC 300
 TCGGTTAGCC CGGTTAAGGC T

ALP 242

Ser-Gly-Lys-Ser-Phe-Lys-Ala-Gly-Val-Cys-Pro-Pro-Lys-Lys-Ser-Ala-Gln-Cys- 18
 Leu-Arg-Tyr-Lys-Lys-Pro-Glu-Cys-Gln-Ser-Asp-Trp-Gln-Cys-Pro-Gly-Lys-Lys- 36
 Arg-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Cys-Gly-Ile-Lys-Cys-Leu-Asp-Pro-Val-Asp-Thr-Pro- 54
 Asn-Pro-Thr-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Lys-Cys-Pro-Val-Thr-Tyr-Gly-Gln-Cys-Leu- 72
 Leu-Leu-Asn-Pro-Pro-Asn-Phe-Cys-Glu-Met-Asp-Gly-Gln-Cys-Lys-Arg-Asp-Leu- 90
 Lys-Cys-Cys-Met-Gly-Met-Cys-Gly-Lys-Ser-Cys-Val-Ser-Pro-Val-Lys-Ala 107

11/19

8. ábra

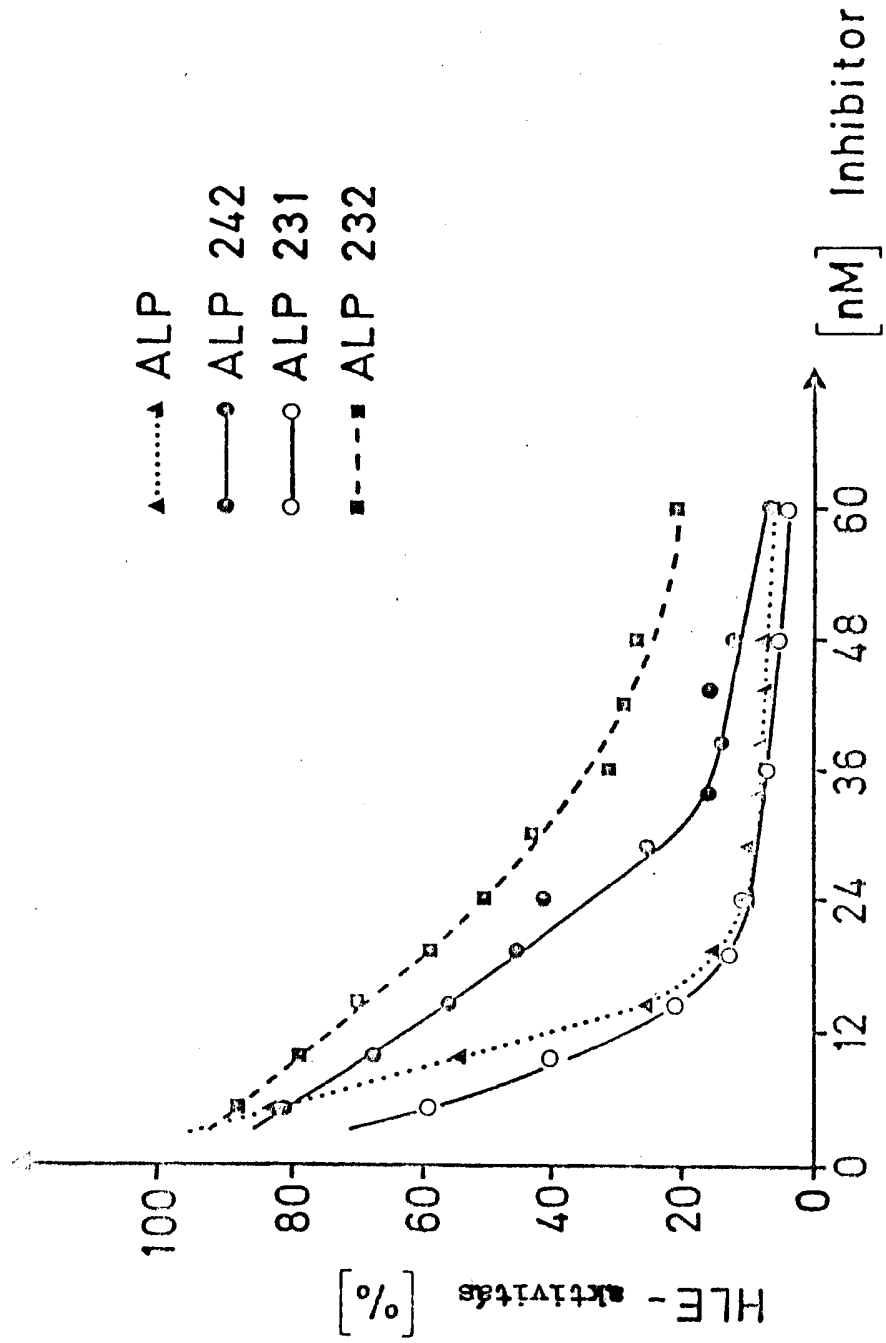
ALP 246 gén

AGCGGTAAGT CTTTCAAAGC CGGCGTCTGT CCTCCTAAGA AATCTGCTCA GTGCCTGCGT 60
 TACAAGAAAC CCGAGTGCCA GTCTGACTGG CAGTGTCTTG GTAAGAAGCG TTGTTGTCCT 120
 GACACTTGTG GTATCAAATG CCTGGATCCG GTTGACACCC CGAACCCGAC GCGTCGTAAA 180
 CCCGGGAAGT GCCCGGTTAC CGAAGGTCAG TGCCTGCTGC TGAACCCGCC TAACTTCTGC 240
 GAGATGGATG GCCAGTGCAA ACGAGATCTG AAATGCTGCA TGGGTATGTG CGGTAAAAGC 300
 TCGGTTAGCC CGGTTAAGGC T

ALP 246

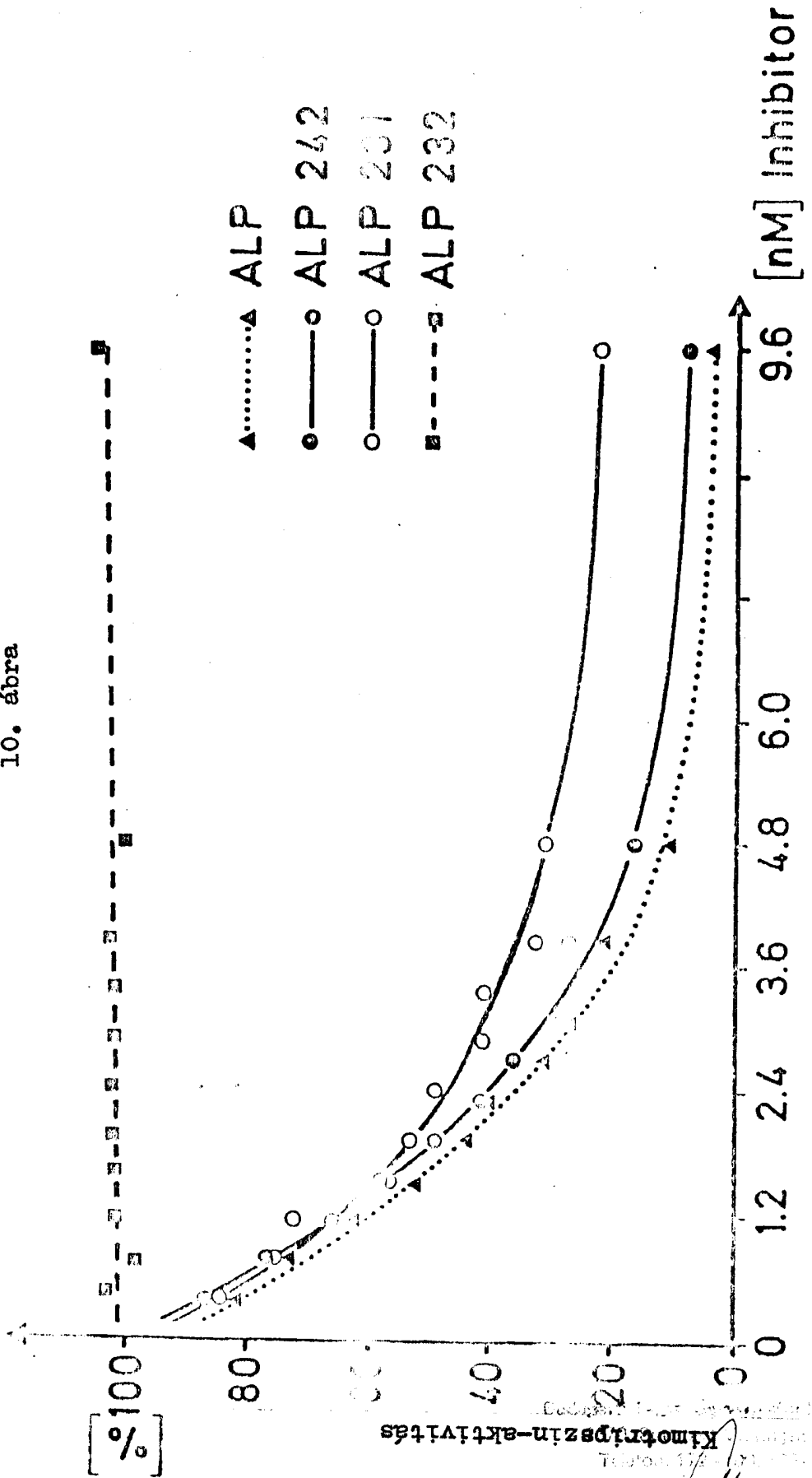
Ser-Gly-Lys-Ser-Phe-Lys-Ala-Gly-Val-Cys-Pro-Pro-Lys-Lys-Ser-Ala-Gln-Cys- 18
 Leu-Arg-Tyr-Lys-Lys-Pro-Glu-Cys-Gln-Ser-Asp-Trp-Gln-Cys-Pro-Gly-Lys-Lys- 36
 Arg-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Cys-Gly-Ile-Lys-Cys-Leu-Asp-Pro-Val-Asp-Thr-Pro- 54
 Asn-Pro-Thr-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Lys-Cys-Pro-Val-Thr-Glu-Gly-Gln-Cys-Leu- 72
 Leu-Leu-Asn-Pro-Pro-Asn-Phe-Cys-Glu-Met-Asp-Gly-Gln-Cys-Lys-Arg-Asp-Leu- 90
 Lys-Cys-Cys-Met-Gly-Met-Cys-Gly-Lys-Ser-Cys-Val-Ser-Pro-Val-Lys-Ala 107

9. ábra



[Handwritten signature]

10. ábra

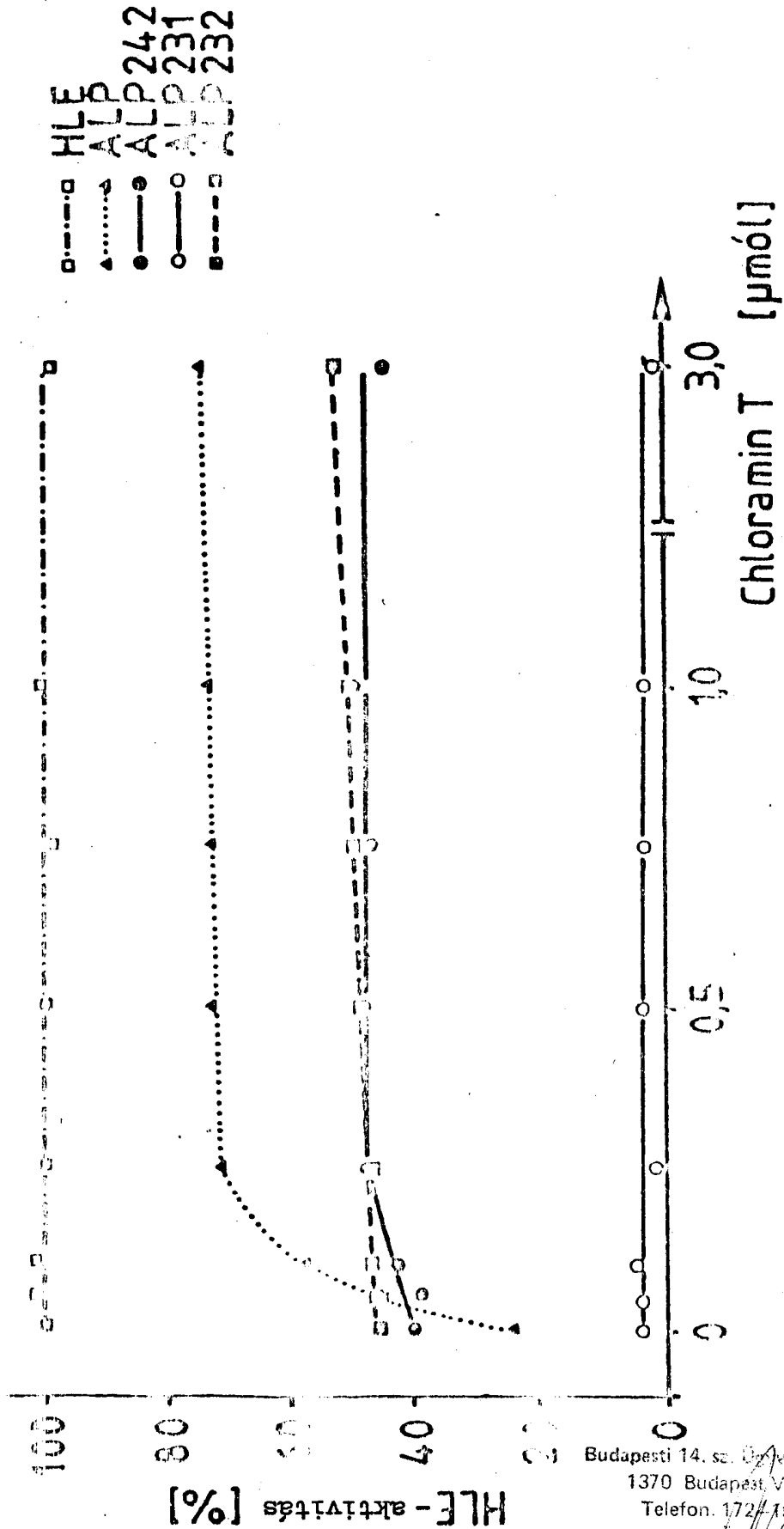


Kimo tripszin-aktivitás

Dr. JALSO S. KÖNYVREGYÉNYÉ

Ügyvéd

11. ábra



Budapesti 14. sz. Orvosi Munkaközösség

1370 Budapest, V., Engels ter. 2.

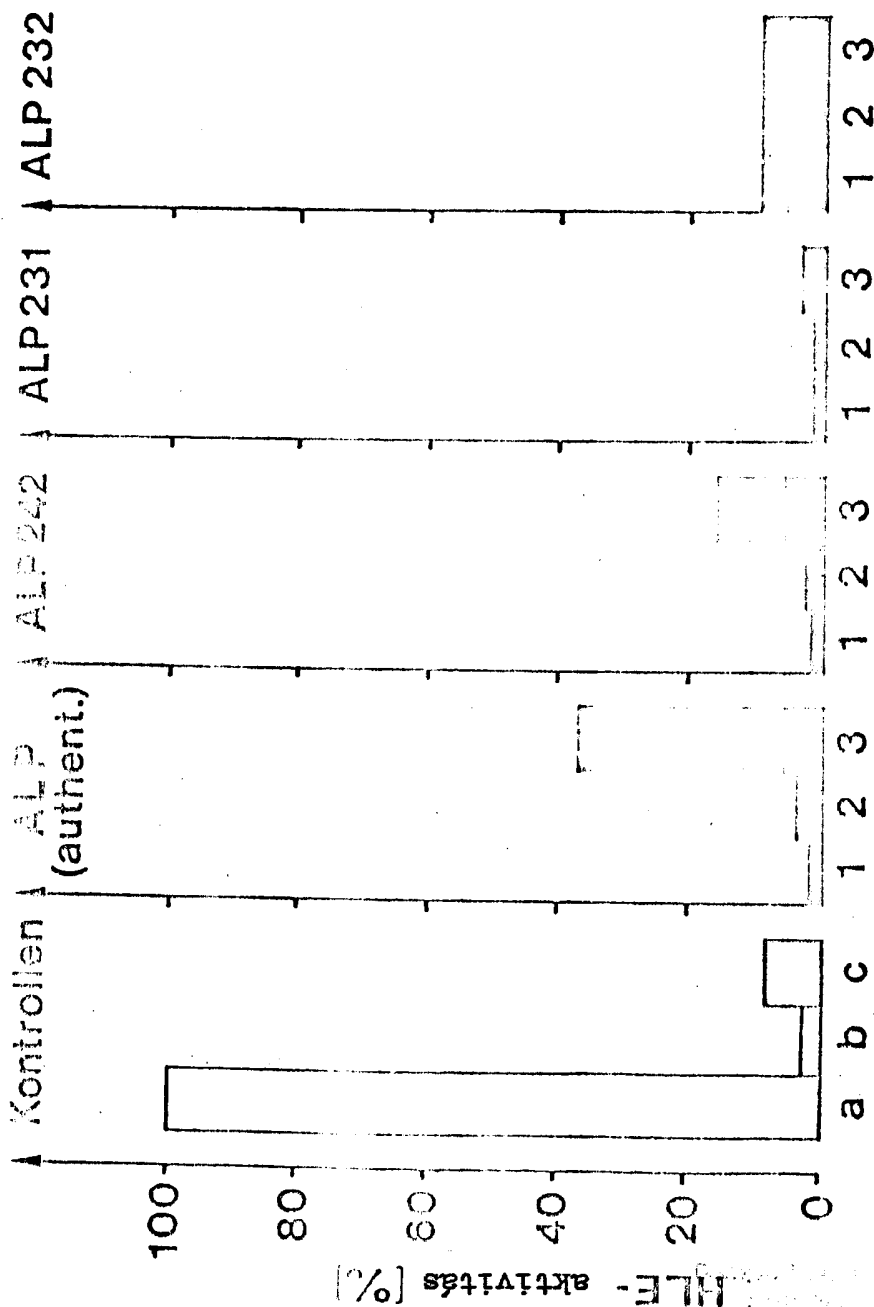
Telefon: 172-193, 172-193

Ügyvezető

Dr. JALSOVSKY GYÖRGYNÉ

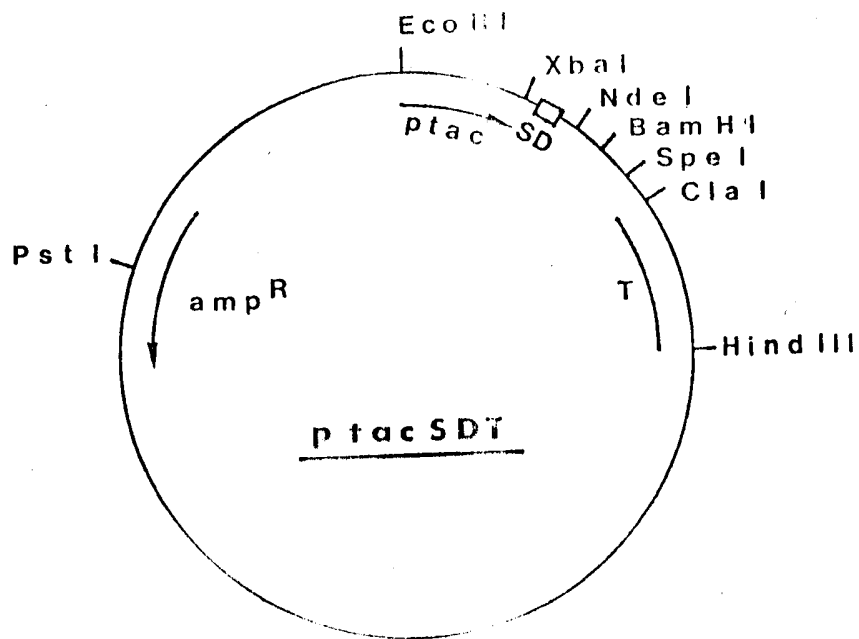
ügyvéd

12. ábra



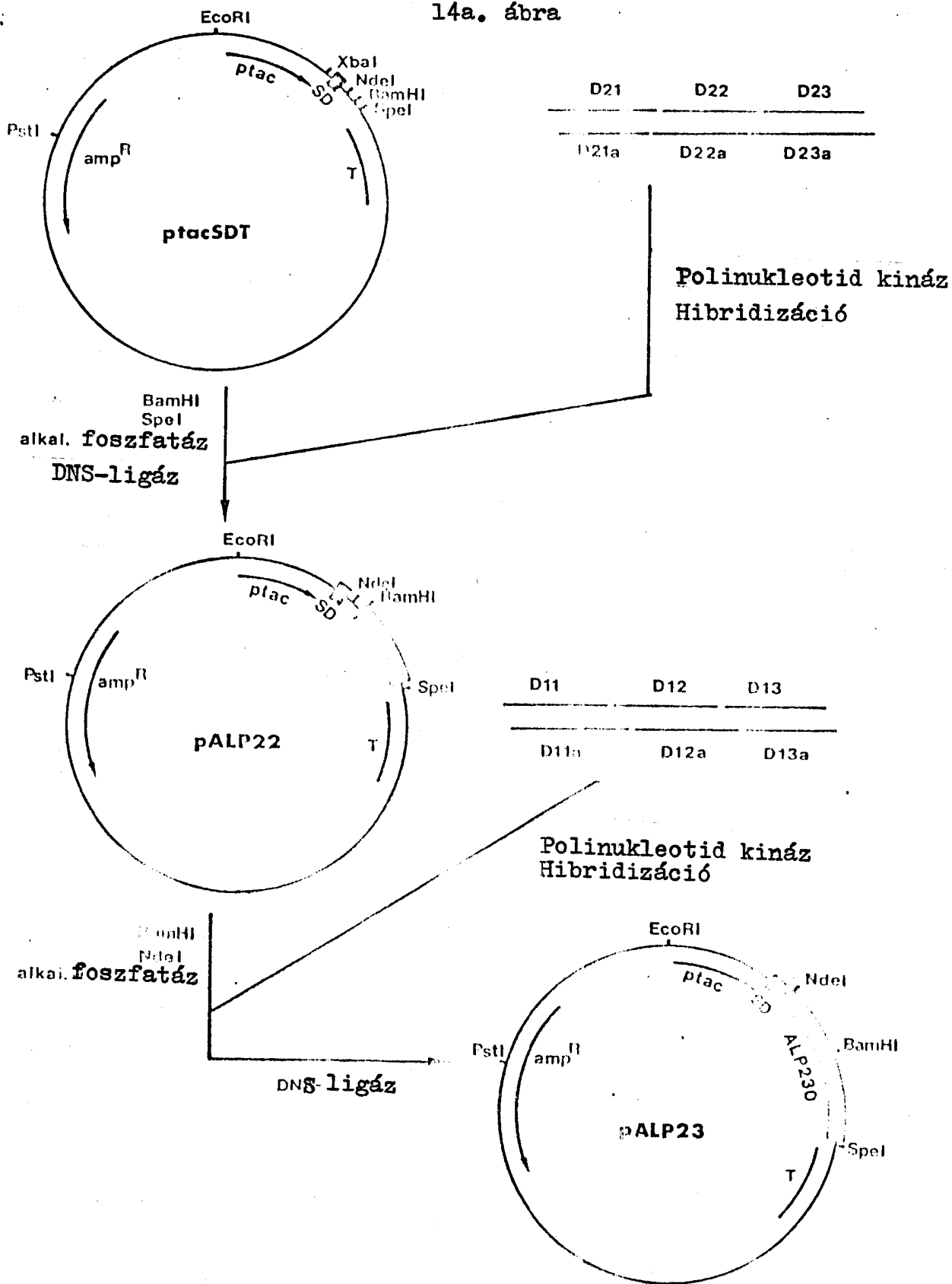
[Handwritten signature]

13. ábra

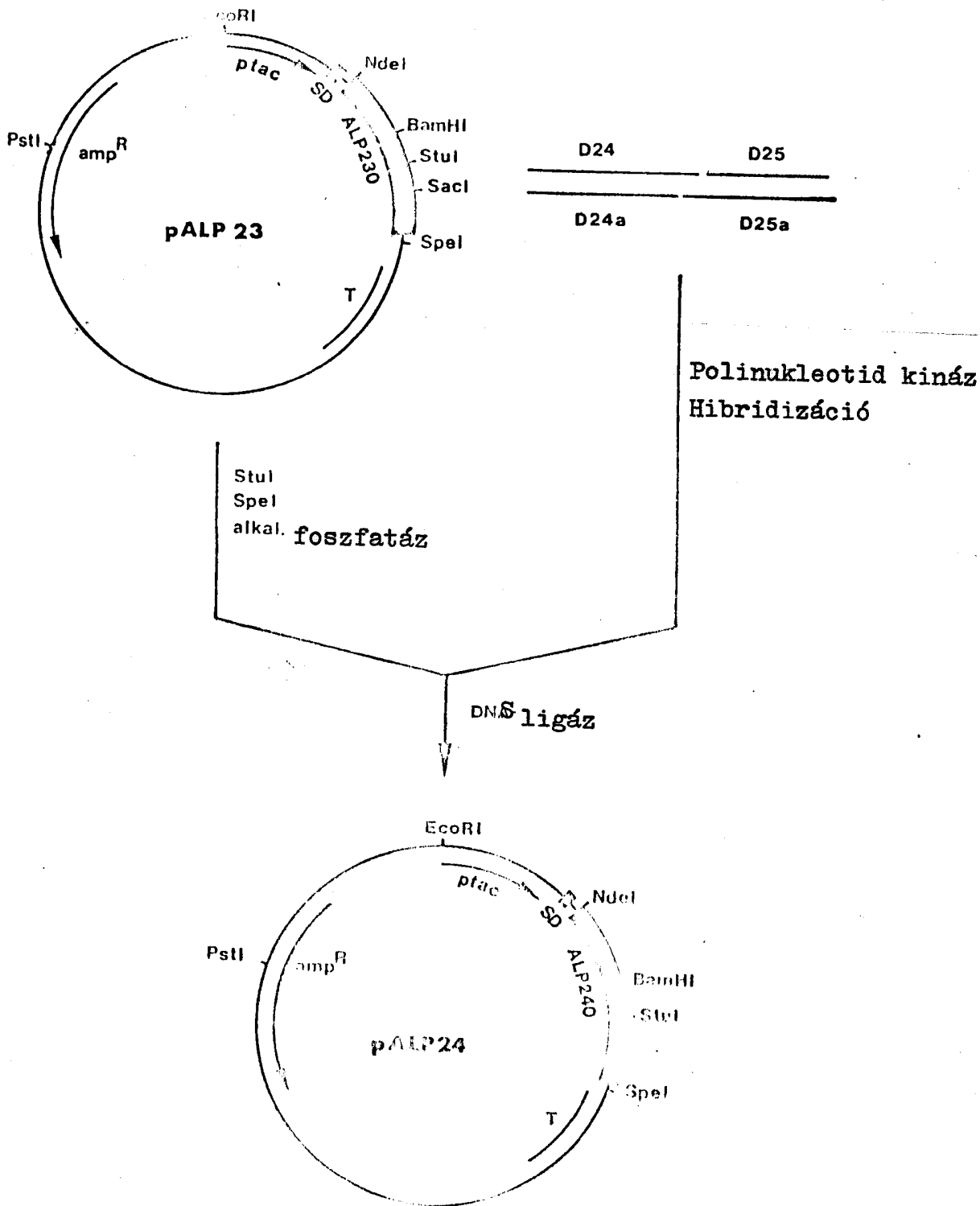


Budapest 10. sz. Megyei Bíróság
1370 Dr. JALOSI, Széchenyi 2.
Telefon: 174 100 100
Dr. JALOSI, Dr. JALOSI
Dr. JALOSI, Dr. JALOSI

14a. ábra



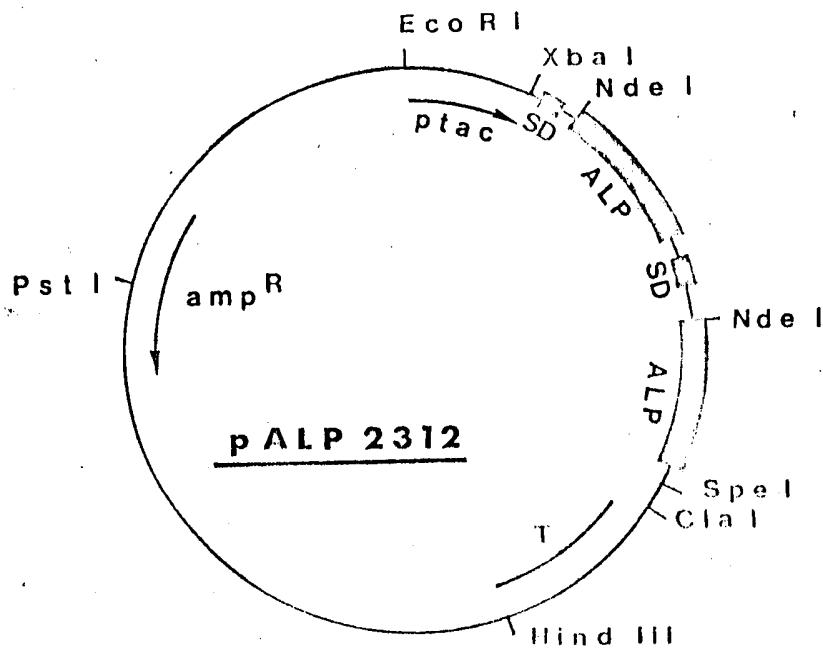
14b. ábra



Budapesti 11. sz. Újpesti Munkások Szövetsége
 1370 Budapest, Újpesti körút 2.
 Telefon: 72-196, 172-165
 Ügyvezető
 Dr. JALOSVÉNYI ZYÓRGY LÉ

19/19

15. ábra



Budapesti 14. sz. Ügyvédi Munkaközösség
 1370 Budapest, V., Erzsébet tér 2.
 Telefon: 172-199, 172-193
 Ügyintéző:
 Dr. JALSOVÁZKY GYÖRGYGNÉ
 ügyvéd