



F1000097139B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen(B) (11) KUULUTUSJULKAISU  
UTLAGGNINGSSKRIFT

97139

C (45) Patentti myönnetty  
Patent meddelat 25 10 1976

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

C 07K 14/81, C 12N 15/15, C 12P 21/02

(21) Patentihakemus - Patentansökning	880017
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	05.01.88
(24) Alkuperäisyys - Löpdag	05.01.88
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	08.07.88
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.07.96
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
07.01.87 GB 8700204 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Bayer Aktiengesellschaft, 5090 Leverkusen, Germany, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Collins, John, Aegidienstrasse 5, 3300 Braunschweig, Germany, (DE)  
 2. Blöcker, Helmut, Maschplatz 13, 3300 Braunschweig, Germany, (DE)  
 3. Frank, Ronald, Leibnitzstrasse 8, 3340 Wolfenbuettel, Germany, (DE)  
 4. Maywald, Friedhelm, Elzweg 32, 3300 Braunschweig, Germany, (DE)  
 5. Fritz, Hans, Neulingerstrasse 15, 8011 Hohenbrunn, Germany, (DE)  
 6. Bruns, Wolfgang, Kaiser-Wilhelm-Allee 37, 5600 Wuppertal 1, Germany, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä haiman erittämän trypsiini-inhibiittorivarianttien valmistamiseksi ja menetelmässä käytettävä DNA, vektori ja isäntäsolu  
 Förfarande för framställning av varianter av pankreatisk sekretorisk trypsininhibitor och vid förfarandet använt DNA, använd vektor och värdcell

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 12364 NCIMB  
12365 NCIMB

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP B 132732 (C 07K 7/10)  
 Arch. Biochem. Biophys. 179 (1977) 189-199 (Bartelt et al.), J. Biochem. 98 (1985) 687-694 (Kikuchi et al.), Biochem. Biophys. Res. Comm. 132 (2) (1985) 605-612 (Yamamoto et al.), EMBO J. 5 (2) (1986) 3219-3225 (von Wilcken-Bergmann et al.), J. Biol. Chem. 261 (16) (1986) 7115-7118 (Marks et al.)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Kyseinen keksintö koskee peptidiä, joka oleellisesti käsittää haiman erittämän trypsiini-inhibiittorin (PSTI:n) aminohapposekvenssin. Keksintö koskee tämän peptidin variantteja, joissa yksi tai useampi alkuperäisen sekvenssin aminohapoista on korvattu muulla tai muilla aminohapoilla. Nämä peptidit ovat inhibiittorivaikutuksensa spesifisyyden osalta edullisesti modifioituneet. Kuvataan lisäksi menetelmää kyseisten peptidien valmistamiseksi sekä niiden farmaseuttista käyttöä.

Ifrågavarande uppfinning avser en peptid, som väsentligen uppvisar aminosyrasekvensen hos den pankreatiska sekretoriska trypsininhibitorn (PSTI). Uppfinningen avser varianter av denna peptid, vari en eller flera av originalsekvensens aminosyror ersatts av andra aminosyror. Dessa peptider har med hänsyn till specifiteten av deras inhibitorverkan modifierats på ett fördelaktigt sätt. Ytterligare beskrivs ett förfarande för framställning av peptiderna ävensom deras farmaceutiska användning.

Menetelmä haiman erittämän trypsiini-inhibiittorivarianttien valmistamiseksi ja menetelmässä käytettävä DNA, vektori ja isäntäsolu

5 Keksintö koskee menetelmää peptidin valmistamiseksi, joka oleelliselta osin käsittää ihmishaiman erittämän trypsiini-inhibiittorin (h-PSTI) aminohapposekvenssin variantteja, joissa yksi tai useampi alkuperäisen aminohapposekvenssin jäännöksistä on korvattu muulla aminohappojäännöksellä tai muilla aminohappojäännöksillä. Tarkemmin  
10 ilmaistuna keksintö koskee menetelmää peptidin valmistamiseksi, joka oleellisesti käsittää ihmisen haiman erittämän trypsiini-inhibiittorin (PSTI:n) sekvenssin variantin ryhmästä

15

	PSTI	1	Thr-17	Leu-18	Ile-19	Tyr-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	2	Thr-17	Leu-18	Ile-19	Tyr-20	Asp-21	Asn-29
	PSTI	4	Thr-17	Leu-18	Glu-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29
	PSTI	5	Thr-17	Val-18	Glu-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29
20	PSTI	6	Thr-17	Leu-18	Glu-19	Tyr-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	7	Thr-17	Leu-18	Ile-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29
	PSTI	8	Thr-17	Val-18	Glu-19	Leu-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	9	Thr-17	Val-18	Glu-19	Leu-20	Arg-21	Asp-29
	PSTI	11	Pro-17	Leu-18	Glu-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29
25	PSTI	12	Pro-17	Val-18	Glu-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29
	PSTI	13	Thr-17	Ile-18	Glu-19	Tyr-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	17	Thr-17	Val-18	Ile-19	Tyr-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	18	Thr-17	Ile-18	Ile-19	Tyr-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	19	Thr-17	Val-18	Ile-19	Tyr-20	Asp-21	Asn-29
30	PSTI	20	Thr-17	Ile-18	Ile-19	Tyr-20	Asp-21	Asn-29
	PSTI	21	Thr-17	Ile-18	Glu-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29

jolloin variantti käsittää edelleen asemassa 32 ryhmän Pro, Ser tai Ala. Näiden peptidien inhibiatiovaikutus on  
35 spesifisyytensä osalta edullisesti modifioitunut. Lisäksi

:

keksintö koskee mentelmässä käytettyä DNA:ta, ilmaisuvektoria sekä bakteeri-isäntä-organismia.

Polymorfitumagranulosyyttien lysosomaalinen elastaasi (leukosyyttielastaasi), J.G. Bieth, Regulation of Matrix Accumulation, Mecham, julk., Academic Press, Orlando, 1986, s. 217-320, on tehokas solunsisäinen proteaasi, joka varastoituu lysosomeihin ja joka suorittaa fysiologisia toimintojaan, solunsisäistä proteiinien hajottamista, fagolysosomeissa. Tärkein lysosomaalisten proteaasien (elastaasin, katepsiini G:n jne., H. Fritz et. al., Selected Topics in Clinical Enzymology, Goldberg ja Werner, julk., Walter de Gruyter, Verliini, Bd. 2, 1984, s. 305-328) suorittama funktionaalinen toiminto on organismin itsensä muodostaman fagosytoosimateriaalin (esim. aineenvaihduntatuotteet, vaurioitunut kudos) ja vieraiden organismien (bakteerien, viruksien, homesienten jne.) muodostaman materiaalin hajottaminen.

Kun elastaasia on vapautunut solunulkoiseen tilaan (vereen tai soluvälinesteeseen), sen sitovat nopeasti aktiiviset endogeeniset inhibiittorit, kuten  $\alpha_1$ -PI ( $\alpha_1$ -proteaasi-inhibiittori, J. Travis ja G.S. Salvesen, Ann. Rev. Biochem. (1983) 655-709) plasmassa ja/tai antileukoproteaasi (kutsutaan myös nimellä HUSI-I, ihmisen siemennesteeseen proteinaasi-inhibiittori, H. Schiessler et al., Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes, Haveman ja Janoff, julk., Urban & Schwarzenberg, Baltimore, 1978, s. 195-207) limaeritteissä.

Huomattavan  $\alpha_1$ -PI-vajauksen (J.G. Bieth, 1986) kyseessä ollessa tai elastaasin runsaan vapautumisen solunulkoiseen tilaan seurauksena (akuuteissa ja kroonisissa tulehdustiloissa, polytrauma- ja shokkitiloissa, H. Fritz et al., 1984) ei luontaisten proteaasi-inhibiittorien elimistölle hajottavaa elastaasivaikutusta vastaan antama suoja ole riittävä. Seurauksena on endogeenisten proteaasi-inhibiittorien liiallinen kulutus ja paikallisesti jopa

täydellinen loppuun käyttö, mitkä johtuvat (i) kompleksinmuodostuksesta elastaasin kanssa, (ii) proteolyyttisestä inaktivoitumisesta useiden lysosomaalisten proteaasien toimesta ja (iii) erityisesti inaktivoitumisesta hapettumisen kautta ( $\alpha_1$ -PI) (J.G. Bieth, 1986, H. Fritz et al. 1984, J. Travis ja G.S. Salvesen, 1983, ks. edellä).

Tästä on seurauksena sidekudoksien laajamittaista proteolyyttistä hajoamista, kuten myös nesteproteiinien, mukaan lukien koagulaatio-, fibrinolyysi- ja komplementitekijöiden, elastaasin ja muiden lysosomaalisten proteaasien (esim. katepsiini G:n) vaikutuksesta, mikä johtaa vakaviin klinisiin oireisiin, kuten ilmapöhön, shokkikeuhkoon, hengityshäiriöihin (ARDS-hengenahdistus, engl. Acquired Respiratory Distress Syndrome), koaguloitumishäiriöihin, munuaisten ja maksan toiminnanvajaukseen jne. (edellä mainittujen viitteiden ohella: Neue Wege in der Entzündungsdiagnostik, PMN Elastase, M. Jochum et al., julk., GIT Verlag, Darmstadt, 1985, C.T. Lee et al., N. Engl. J. Med. 304 (1981) 192-196, W.W. McGuire et al., J. Clin. Invest. 69 (1982) 543).

Elastaasi myötävaikuttaa niin ikään paikallisissa tulehduksissa, kuten nivelreumassa esim. sidekudoksen rakenneosien hajoamisessa (K. Kleesiek et al. (1985), kirjassa Neue Wege in der Entzündungsdiagnostik. PMN Elastase, s. 71-82).

Elastaasin vapautumista solunulkoiseen tilaan vaikeiden haavoittumisten jälkeen tai sairaustilojen, kuten verenmyrkytysshokin, shokkikeuhkon jne. yhteydessä voidaan seurata tavanomaisten entsyymaattisten immuunimääritysten avulla (S. Neumann ja M. Jochum, Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer, julk., Verlag Chemie, Weinheim, 1984, s. 184-195).

Verenmyrkytyksen ja ilmapöhön kokeellisissa malleissa ovat synteettiset elastaasi-inhibiittorit (J.C. Powers Am. Rev. Respir. Dis. 127 (1983) 554-558) ja

luontaiset eläimistä peräisin olevat inhibiittorit, kuten egliini C (H.P. Schnebli et al., Eur. J. Respir. Dis. 66: 139 (1985) 66-70) osoittautuneet terapeuttisesti hyödyllisiksi. Toksisten sivuvaikutusten ja erityisesti herkitysreaktioiden välttämiseksi olisi edullisempaa käyttää ihmisestä peräisin olevaa proteaasi-inhibiittoria silloin, kun hoitoidikaatio on pitkäaikaisterapia, esim.  $\alpha_1$ -PI-va-  
5 jausta hoidettaessa (ilmapöhö). Humaani- $\alpha_1$ -PI:n ollessa korkean molekyylipainon omaava glykoproteiini ei sen määrällisesti riittävään valmistukseen todennäköisesti pys-  
10 tytä lähitulevaisuudessa.

Antileukoproteaasin eli HUSI-I:n (H. Schiessler et al., 1978 ja U. Seemüller et al., Fests Letters 199 (1986) 43-48) molekyylipaino on 14 000 Daltonia ja se koostuu  
15 kahdesta aktiivisesta alueesta, joista toinen on aktiivinen elastaasin ja toinen trypsiinin suhteen. Tämän vuoksi kyseinen inhibiittorilaji ei ole erityisen selektiivinen eikä se siis ole spesifinen elastaasi-inhibiittori. Muutoinkaan trypsiinin tai trypsiinin kaltaisten entsyymien  
20 inhibitiioon ei edellä mainituissa hoitoyhteyksissä pyritä.

Ihmishaima erittää PSTI:tä, proteaasi-inhibiittoria, jonka molekyylipaino on alhainen (6,2 kD) ja joka inhiboi spesifisesti trypsiiniä eli jonka selektiivisyys tietyn proteaasilajin suhteen on korkea.

25 Eräs kyseisen keksinnön etu on, että korvaamalla DNA-rekombinaatiotekniikan avulla vain yksi PSTI:n aminohappojäännös (tai muutamia harvoja), saadaan PSTI-variantteja, jotka ovat osoittautuneet erittäin tehokkaiksi proteaasi-inhibiittoreiksi, joiden spesifisyys leukosyytti-  
30 elastaasin suhteen on korkea. Lisäksi elastaasi-PSTI-johdannaiskompleksi pystyy suhteellisen alhaisen molekyylipainonsa ansiosta läpäisemään myös munuaiset. Tällöin solunulkoiseen tilaan vapautuneen elastaasin eliminoituminen on erittäin tehokasta. Otettaessa huomioon, että PSTI on  
35 alunperin ihmisestä eristetty, minkä lisäksi sen molekyylis-

lipaino on alhainen, arveltiin, ettei PSTI-johdannaisten kliniseen käyttöön liittyisi komplikaatioita sen johdosta, että immuunijärjestelmä tunnistaisi nämä yhdisteet elimistölle vieraiksi proteiineiksi.

5            $\alpha_1$ -PI:hin ja antileukoproteaasiin verrattuna PSTI:n oleellinen lisäetu on niin ikään sen epäherkkyys hapettumisen aiheuttamalle inaktivoitumiselle tulehdustilan eri vaiheissa, joissa muodostuu ja vapautuu solunulkoiseen tilaan voimakkaasti hapettavia yhdisteitä. Täten  $\alpha_1$ -PI:hin ja  
10 antileukoproteaasiin verrattuna tulisi PSTI-johdannaisten alhaisempina annoksina kyetä tarjoamaan samanarvoinen suojavaikutus.

Kyseisen keksinnön tehtävä on täten tarjota käyttöön farmaseuttisesti hyödyllisiä peptidejä, joilla on  
15 proteinaasi-inhibiittorivaikutusta, edullisesti sellaisia, joiden spesifisyys on parempi ja/tai inhibiiovaikutus tehokkaampi (kuin edellä mainittujen). Mainitut peptidit ovat DNA-rekombinaatiotekniikan avulla tuotettuja peptidejä, jotka käsittävät PSTI:n sekvenssin tai variantteja.  
20 Sanonnalla "variantit" tarkoitetaan peptidejä, joissa perusaminohapposekvenssin jäännöksistä yksi tai useampia on korvattu muulla tai muilla luontaisesti esiintyvien aminohappojen jäännöksillä. Perussekvenssillä tarkoitetaan hu  
maani-PSTI:n aminohapposekvenssiä (h-PSTI = PSTI-0). Ami  
25 nohappojäännösasemia, joissa korvaus edullisesti suoritetaan, ovat peptidin asemat 17, 18, 19, 20, 21, 29 ja 32. Kyseisen keksinnön mukaan valmistetaan erityisesti edullisia peptidejä, joiden sekvenssi on oleellisesti sama kuin  
PSTI-0:n (sellaisena kuin sen on esittänyt L.J. Greene,  
30 Methods Enzymol. 45 (1976) 813-825) ja jotka sisältävät seuraavat aminohappojäännökset:

Thr tai Pro asemassa 17;  
Leu, Val tai Ile asemassa 18;  
Glu tai Ile asemassa 19;  
35 Tyr tai Leu asemassa 20;

Arg, Asp tai Asn asemassa 21;

Asp tai Asn asemassa 29;

Pro, Ser tai Ala asemassa 32.

5 Taulukossa 1 on esitetty eräitä variantteja PSTI-  
0:n ollessa perussekvenssi ja aminohappojäännöksiä ase-  
massa 32 ja 36 ollessa proliini ja vastaavasti valiini.

Taulukossa 1 esitettyjä variantteja voidaan edel-  
leen muuntaa sijoittamalla asemaan 32 jokin aminohappo-  
jäännöksistä Ser tai Ala.

10 Esillä olevassa hakemuksessa kuvataan myös edellä  
kuvatun mukaisen sekvenssin omaavia peptidejä, jotka li-  
säksi käsittävät asemassa 1 metioniinin tai johtopeptidin.  
Sanonnalla johtopeptidi ei kyseisen keksinnön yhteydessä  
tarkoiteta ainoastaan ilmaisutuotteiden erityistä edistäviä  
15 signaalisekvenssejä (S.D. Emr et al. J. of Cell Biol.  
(1980) 701-711), vaan myös peptidejä, jotka omaavat PSTI-  
sekvenssiä edeltävän signaalisekvenssin ja liittosekvens-  
sin.

Taulukko 1  
PSTI-variantteja

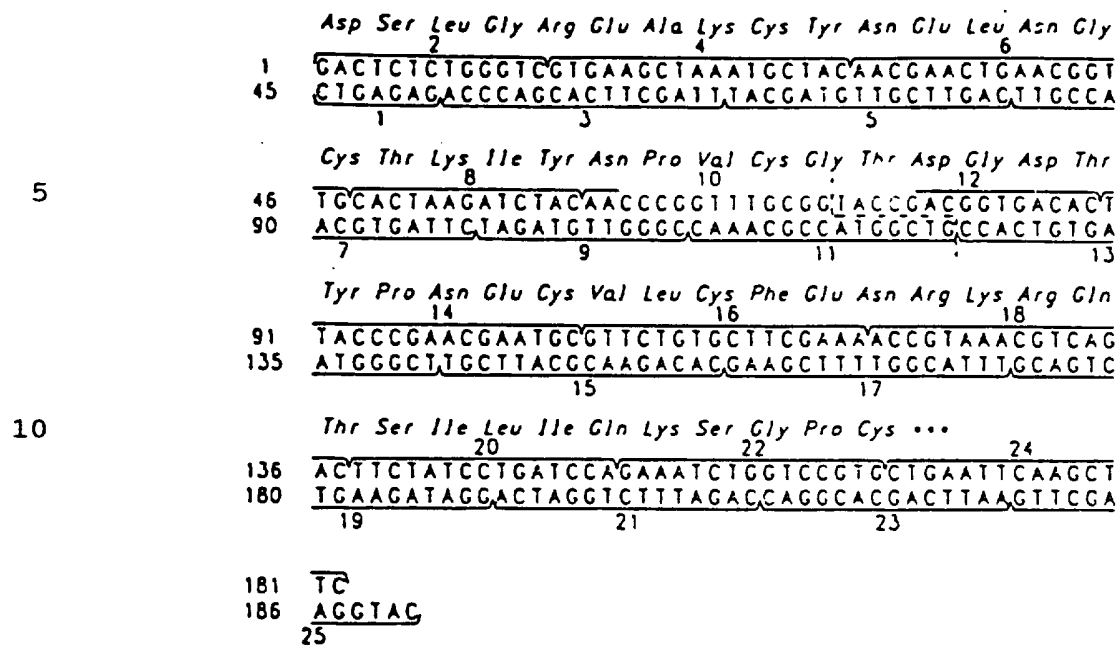
Asema		17	18	19	20	21	29
5	x) PSTI 0	Thr	Lys	Ile	Tyr	Asn	Asp
	PSTI 1	Thr	Leu	Ile	Tyr	Asn	Asp
	PSTI 2	Thr	Leu	Ile	Tyr	Asp	Asn
	x) PSTI 3	Thr	Tyr	Glu	Tyr	Arg	Asp
10	PSTI 4	Thr	Leu	Glu	Tyr	Arg	Asp
	PSTI 5	Thr	Val	Glu	Tyr	Arg	Asp
	PSTI 6	Thr	Leu	Glu	Tyr	Asn	Asp
	PSTI 7	Thr	Leu	Ile	Tyr	Arg	Asp
	PSTI 8	Thr	Val	Glu	Leu	Asn	Asp
15	PSTI 9	Thr	Val	Glu	Leu	Arg	Asp
	x) PSTI 10	Pro	Lys	Ile	Tyr	Asp	Asn
	PSTI 11	Pro	Leu	Glu	Tyr	Arg	Asp
	PSTI 12	Pro	Val	Glu	Tyr	Arg	Asp
	PSTI 13	Thr	Ile	Glu	Tyr	Asn	Asp
20	x) PSTI 14	Thr	Arg	Glu	Tyr	Asn	Asp
	x) PSTI 15	Thr	Phe	Glu	Tyr	Asn	Asp
	x) PSTI 16	Thr	Ala	Glu	Tyr	Asn	Asp
	PSTI 17	Thr	Val	Ile	Tyr	Asn	Asp
	PSTI 18	Thr	Ile	Ile	Tyr	Asn	Asp
25	PSTI 19	Thr	Val	Ile	Tyr	Asp	Asn
	PSTI 20	Thr	Ile	Ile	Tyr	Asp	Asn
	PSTI 21	Thr	Ile	Glu	Tyr	Arg	Asp
	x) PSTI 22	Thr	Tyr	Ile	Tyr	Asn	Asp
	x) PSTI 23	Thr	Phe	Ile	Tyr	Asn	Asp
30	x) PSTI 24	Thr	Lys	Glu	Tyr	Arg	Asp

x) vertailu

Kyseinen keksintö koskee myös keksinnön mukaisesti valmistettavia aminohapposekvenssejä koodaavia DNA-sekvenssejä. Jatkotekstissä seuraavaa sekvenssiä kutsutaan päägeeniksi:

35





Kuvio 1: PSTI-päägeenin nukleotidi- ja vastaava aminohapposekvenssi. Sulkumerkinnoilla ja liittyvillä numeroilla viitataan geeniä rakennettaessa käytettyihin synteettisiin oligonukleotideihin. Katkoviivalla osoitetaan geenin jakaantumiskohta segmenttiin I (ensimmäinen osa) ja segmenttiin II (toinen osa) sekä mainitun DNA-sekvenssin funktionaalisia ekvivalentteja. Funktionaalisilla ekvivalenteilla tarkoitetaan tällöin saman proteiinin ilmaisuun mahdollisesti soveltuvia edellä esitetyn DNA-sekvenssin johdannaisia. Alan ammattilaisille on tuttua, että tietyissä kodoneissa yksi emäs tai kaksi tai kolme emästä voi olla korvattu muulla emäksellä, ilman että tällä on vaikutusta tiettyyn proteiiniin rakentuvaan aminohappoon. Peptidijohdannaisten valmistamiseksi päägeeniä modifioidaan DNA-tekniikan avulla siten, että tietyn aminohapon koodoni tietyssä asemassa korvataan toisen aminohapon kodonilla. DNA:n saamiseksi, joka koodaa jotain kyseisen keksinnön mukaisesti valmistettavaa peptidijohdannaista, voidaan asemassa 17, 18, 19, 20, 21, 29 ja 32 sijaitsevien aminohappojen kodoneja korvata muilla kodoneilla.

Korvauksessa käytettäväksi edullisia kodoneja ovat ne, jotka koodaavat edellä lueteltuja aminohappojäännöksiä. Käytetystä ilmaisujärjestelmästä riippuen voi keksinnön mukainen DNA olla myös sekvenssi, joka koodaa jotain edellä esitettyä peptidiä ja käsittää lisäksi johtopeptidiä koodaavan NH<sub>2</sub>-päätysekvenssin.

Keksintö koskee edelleen ilmaisuvektoria, jota nimitetään myös plasmidiksi ja joka sisältää jotain kyseisen keksinnön mukaisesti valmistettavaa peptidiä koodaavan DNA:n. Plasmidiä käytetään isäntäorganismien transformoinnissa. Keksintö koskee myös näin transformoituja bakteerisäntäorganismeja. Alan ammattilaisten tiedossa on lukuisia transformoitaviksi soveltuvia mikro-organismeja. Käytettävän plasmidin tyyppi valitaan pääasiallisesti käytettävän isäntäorganismien mukaan.

Keksinnön mukaista DNA:ta sisältävällä plasmidilla transformoitavaa isäntäorganismia käytetään edellä mainittuja peptidivarianttien valmistuksessa. Keksinnön mukaiselle menetelmälle PSTI:n varianttien valmistamiseksi on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 1 esitetään. Valmistus käsittää seuraavat vaiheet:

(a) isäntämikro-organismien tartuttaminen sopivissa olosuhteissa,

(b) peptidin talteenotto viljelmästä, ja

(c) peptidin puhdistus.

Peptidin puhdistus voidaan suorittaa tavanomaisilla proteiinikemian menetelmillä, esim. saostamalla tai kromatografian tai elektroforeesin avulla. Edellä mainittu liittopeptidi voidaan rakentaa sellaiseksi, että rakenne helpottaa fuusioproteiinin puhdistusta. Liittopeptidin sisältäessä esimerkiksi pääasiallisesti joko emäksisiä tai happamia aminohappojäännöksiä voi ilmaistun tuotteen puhdistuksessa ioninvaihtokromatografia osoittautua erityisen edulliseksi.

Edellä kuvattuja peptidejä voidaan käyttää farmaseuttisten valmisteiden valmistuksessa. Näitä farmaseuttisia valmisteita käytetään erityisesti aiemmin mainittujen hoitoindikaatioiden yhteydessä.

5 Farmaseuttiset valmisteet sisältävät yhden tai useamman edellä kuvatun peptidin ohella myrkyttömiä, inerttejä ja farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantajia ja/tai lisäaineita tai ne voivat koostua pelkästään yhdestä tai useammasta keksinnön mukaisesta vaikuttavasta aineesta.

10 PSTI:tä voidaan eristää haimasta, josta sitä kuitenkin ei ole saatavissa vähäistä suurempia määriä, erityisesti ei eristettäessä sitä ihmishaimasta.

Tämän vuoksi todettiin DNA-rekombinaatiotekniikan  
15 sekä liittyvien teknologioiden tarjoavan tehokkaan tien valmistaa riittävän suuria määriä sekä korkealaatuista h-PSTI:tä että kyseisen peptidin variantteja. Vieraspoteiinin tuottaminen rekombinanttibakteereissa ei ole yksinkertaista viitaten useissa tapauksissa ilmenneeseen epästabiilisuuteen (B.E. Butterworth ja B.D. Kovant, J. Virol. 14 (1984) 282-291, D.V. Goeddel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 106-110, M. Inouye et. al. kirjassa The Future in Nucleic Acid Research, I. Watanabe, julk., Academic Press, Tokio, 1983). Epästabiilisuus on  
20 ongelma erityisesti ilmaistaessa peptidejä, joiden ketju on verraten lyhyt.

Ihmisen haima erittää PSTI:tä, proteaasi-inhibiittoria, jonka molekyylipaino on alhainen (6,2 kD) ja joka spesifisesti inhiboi trypsiinin, eli jonka selektiivisyys tietyn proteaasityypin suhteen on korkea.

30 Eräs keksinnön mukaisen käytännön etu on, että korvaamalla ainoastaan yksi PSTI:n aminohappojäännös (tai muutamia harvoja) DNA-rekombinaatiotekniikan avulla, saadaan PSTI-variantteja, jotka ovat osoittautuneet erittäin tehokkaiksi proteaasi-inhibiittoreiksi, joiden spesifisyys  
35

leukosyyttielastaasin suhteen on korkea. Lisäksi verraten alhaisen molekyyllipainonsa ansiosta elastassi-PSTI-johdannaiskompleksi läpäissee myös munuaiset. Tällä perusteella voidaan odottaa solunulkoiseen tilaan vapautuneen elastasiin eliminoituvan erityisen tehokkaasti. Koska PSTI on peräisin ihmisestä sen molekyyllipainon ollessa lisäksi alhainen, voidaan olettaa, ettei PSTI-johdannaisten kliinisessä käytössä ilmene komplikaatioita sen johdosta, että immuunijärjestelmä tunnistaisi nämä yhdisteet vieraiaksi proteiineiksi.

$\alpha_1$ -PI:hin ja antileukoproteaasiin verrattuna PSTI:n toinen huomattava etu on sen epäherkkyys inaktivoivalle hapettumiselle tulehdustilan eri vaiheissa, joissa muodostuu ja vapautuu voimakkaasti hapettavia aineita. Täten  $\alpha_1$ -PI:hin tai antileukoproteaasiin verrattuna pienempien PSTI-johdannaismäärien tulisi riittää tuottamaan rinnastettavissa oleva suojavaikutus.

#### Geenisekvenssit

h-PSTI:n aminohapposekvenssi translatoitiin takaisin DNA-päägeenisekvenssiin tehokkaasti ilmaistuvissa E. coli -geeneissä yleisimmin tavattujen kodonien avulla (M. Gouy ja C. Gautier, Nucleic Acids Res. 10 (1982) 7055-7074), ks. kuvio 1. PSTI-varianttien aminohapposubstitutiota varten (taulukko 1) korvattiin vastaavat kodonit päägeenissä (ks. taulukko 2).

Taulukossa 2 tähdellä merkittyjä kodoneja käytettiin kautta linjan seuraavin poikkeuksin:

Thr 26 (ACC) kaikissa geeneissä KpnI-kohdan tuottamiseksi asemaan 72 - 77,

Lys 18 (AAG) PSTI-0:ssa ja -10:ssä BglII-kohdan tuottamiseksi asemaan 53 - 58,

Gly 28 (GGC) PSTI-2:ssa, -10:ssä, -19:ssä ja -20:ssa vastaavien oligonukleotidifragmenttien oikeansuuntaiseksi hybridisoimiseksi (ks. alla),

Pro 17 (CCT) + Leu 18 (CTA) PSTI-11:ssä XbaI-kohdan tuottamiseksi asemaan 51 - 56,  
geenin 5'-päädyssä: ensimmäinen kodoni käsittää HincII-kohdan GTPyPuAC jälkimmäisen puolikkaan,  
5 geenin 3'-päädyssä: lopetuskodoni TGA, joka limit-  
tyy EcoRI-kohtaan (asemat 170 - 175), jota seuraavat Hind-  
III-kohta (asemat 176 - 181) ja NcoI-tarttuva pääty (ase-  
mat 182 - 186).

Taulukko 2 Käytetyt kodonit

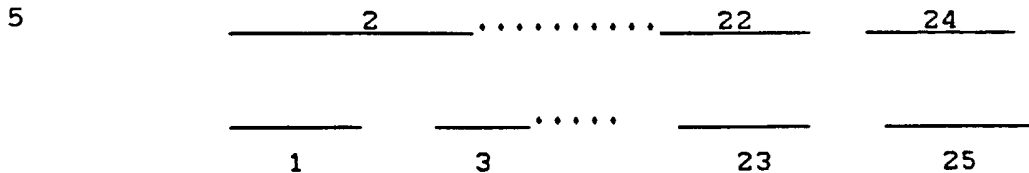
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile
GCA	AGA	GAC*	AAC*	UGC*	GAA*	CAA	GGA	CAC	AUA
GCC	AGG	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG*	GGC	CAU	AUC*
GCG	CGA						GGG		AUU
GCU*	CGC						GGU*		
	CGG								
	CGU*								

Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	Lopetus- kodonit
UUA	AAA*	AUG	UUC*	CCA	AGC	ACA	UGG	UAC*	GUA	UAA
UUG	AAG		UUU	CCC	AGU	ACC		UAU	GUC	UAG
CUA				CCG*	UCA	ACG			GUG	UGA*
CUC				CCU	UCC	ACU*			GUU*	
CUG*					UCG					
CUU					UCU*					

PSTI-geeni rakennettiin seuraavasti:

(1) 25 lyhytketjuisen oligonukleotidin synteesi (12 ja 13 kutakin komplementoivaa säiettä kohden)



10 jolloin muutamille varianteille syntetisoitiin spesifisiä fragmentteja (ks. taulukko 3). Oikeankokoisen fragmentin eristys ja puhdistus suoritettiin ioninvaihtokromatografian ja HPLC:n avulla.

15 (2) Fragmenttien ligointi valmiin PSTI:n (aminohapot 1 - 56) koodausalueen kaksisäikeisen molekyylin tuottamiseksi aminopäädyn koodisekvenssistään "litteään" ketjupäättyyn ja karboksyylipäättysekvenssistään GAT-yksisäikeiseen 5'-ylijäämäketjupäättyyn. Virheellisten ligatointituotteiden määrän pitämiseksi mahdollisimman pienenä  
 20 oli tässä vaiheessa tärkeää optimoida syntetisoitavat oligonukleotidisekvenssit.

(3) Kloonaus useisiin vektoreihin, esim. pUC8:aan, pGV451:een, M13mp18:aan sekvenssoinnin suorittamiseksi (ks. menetelmän osalta oheista tekstiä).

25 (4) Uusien varianttien muodostaminen paikkaohjautuvan mutageneesin avulla M13-fagivektoreissa spesifisiä synteetisiä oligonukleotidejä käyttäen.

### Taulukko 3

Numeroiden merkitys:

30 Sarake 1: fragmentin järjestysnumero (ks. kuvio 1)  
 Sarakkeet 2 ja 3: fragmentin ensimmäinen ja viimeinen nukleotidiasema päägeenisekvenssissä (5' → 3')

Sarake 4: fragmentin nukleotidisekvenssi (5' → 3')

35 Päägeenin sekvenssistä poikkeavat fragmentit, jotka ovat geenivarianttien rakentamiseksi tarpeellisia, on merkitty pisteillä.

Taulukko 3

PSTI-0 (segmentti I) - päägeeni

Fragmentit 1 - 11

	1	7	1	GAGAGTC
5	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	7	54	40	CTTAGTGCAACCGTT
	8	48	60	CACTAAGATCTAC
	9	66	55	CGGGTTGTAGAT
10	10	61	74	AACCCGGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

PSTI-0 (segmentti II) - päägeeni

fragmentit 12 - 25

15	12	75	89	TACCGACGGTGACAC
	13	97	82	TCGGGTAAGTGCACC
	14	90	105	TTACCCGAACGAATGC
	15	113	98	CACAGAACGCATTTCGT
	16	106	121	GTTCTGTGCTTCGAAA
	17	129	114	TTTACGGTTTTTCGAAG
	18	122	137	ACCGTAAACGTCAGAC
	19	145	130	GGATAGAAGTCTGACC
20	20	138	152	TTCTATCCTGATCCA
	21	160	146	CAGATTTCTGGATCA
	22	153	167	GAAATCTGGTCCGTG
	23	174	161	AATTCAGCACGGAC
	24	168	182	CTGAATTCAAGCTTC
	25	186	175	CATGGAAGCTTG

PSTI-1 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

	1	7	1	GAGAGTC
	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
30	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	CAGAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTCTGATCTAC
	9	66	55	CGGGTTGTAGAT
	10	61	74	AACCCGGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC



## Taulukko 3 (jatkoa)

PSTI-2 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

	1	7	1	GAGAGTC
5	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	CAGAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTCTGATCTAC
	• 9	66	55	CGGGTCGTAGAT
10	• 10	61	74	GACCCGGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

PSTI-3 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

	1	7	1	GAGAGTC
15	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	GTAAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTTACGAATAC
20	• 9	66	55	CGGACGGTATTTC
	• 10	61	74	CGTCCGGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

PSTI-4 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

	1	7	1	GAGAGTC
	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
30	• 7	54	40	CAGAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTCTGGAATAC
	• 9	66	55	CGGACGGTATTTC
	• 10	61	74	CGTCCGGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

## Taulukko 3 (jatkoa)

PSTI-5 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

	1	7	1	GAGAGTC
5	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	AACAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTGTTGAATAC
	• 9	66	55	CGGACGGTATTTC
10	• 10	61	74	CGTCCGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

PSTI-6 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

15	1	7	1	GAGAGTC
	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	CAGAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTCTGGAATAC
20	• 9	66	55	CGGGTTGTATTTC
	10	61	74	AACCCGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

PSTI-7 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

25	1	7	1	GAGAGTC
	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
30	• 7	54	40	CAGAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTCTGATCTAC
	• 9	66	55	CGGACGGTAGAT
	• 10	61	74	CGTCCGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

## Taulukko 3 (jatkoa)

## PSTI-13 (segmentti I)

## fragmentit 1 - 11

	1	7	1	GAGAGTC
5	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	GATAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTATCGAATAC
	• 9	66	55	CGGGTTGTATTTC
10	10	61	74	AACCCGGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

## PSTI-14 (segmentti I)

## fragmentit 1 - 11

	1	7	1	GAGAGTC
15	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	ACGAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTCGTGAATAC
20	• 9	66	55	CGGGTTGTATTTC
	10	61	74	AACCCGGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

## PSTI-15 (segmentti I)

## fragmentit 1 - 11

	1	7	1	GAGAGTC
	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
30	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	GAAAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTTTCGAATAC
	• 9	66	55	CGGGTTGTATTTC
	10	61	74	AACCCGGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

## Taulukko 3 (jatkoa)

PSTI-16 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

	1	7	1	GAGAGTC
5	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	AGCAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTGCTGAATAC
	• 9	66	55	CGGGTTGTATTC
10	10	61	74	AACCCGGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

PSTI-17 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

	1	7	1	GAGAGTC
15	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	AACAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTGTTATCTAC
	9	66	55	CGGGTTGTAGAT
20	10	61	74	AACCCGGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

PSTI-18 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

	1	7	1	GAGAGTC
25	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	GATAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTATCATCTAC
30	9	66	55	CGGGTTGTAGAT
	10	61	74	AACCCGGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

Taulukko 3 (jatkoa)

PSTI-19 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

	1	7	1	GAGAGTC
5	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	AACAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTGTTATCTAC
	• 9	66	55	CGGGTCGTAGAT
10	• 10	61	74	GACCCGGTTTGGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

PSTI-20 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

15	1	7	1	GAGAGTC
	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	GATAGTGCAACCGTT
20	• 8	48	60	CACTATCATCTAC
	• 9	66	55	CGGGTCGTAGAT
	• 10	61	74	GACCCGGTTTGGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

PSTI-A (segmentti II)

fragmentit 12 - 25

25	12	75	89	TACCGACGGTGACAC
	• 13	97	82	TAGCGTAAGTGTACC
	• 14	90	105	TTACGCTAACGAATGC
	15	113	98	CACAGAACGCATTTCGT
	16	106	121	GTTCTGTGCTTCGAAA
30	17	129	114	TTACGGTTTTTCGAAG
	18	122	137	ACCGTAAACGTCAGAC
	19	145	130	GGATAGAAGTCTGACG
	20	138	152	TTCTATCCTGATCCA
	21	160	146	CAGATTTCTGGATCA
	22	153	167	GAAATCTGGTCCGTG
	23	174	161	AATTCAGCACGGAC
	24	168	182	CTGAATTCAGCTTC
35	25	186	175	CATGGAAGCTTG

## Taulukko 3 (jatkoa)

PSTI-S (segmentti II)

fragmentit 12 - 25

	12	75	89	TACCGACGGTGACAC
5	• 13	97	82	TAGAGTAAGTGTCCAC
	• 14	90	105	TACTCTAACGAATGC
	15	113	98	CACAGAACGCATTTCGT
	16	106	121	GTTCTGTGCTTCGAAA
	17	129	114	TTTACGGTTTTTCGAAG
	18	122	137	ACCGTAAACGTCAGAC
	19	145	130	GGATAGAAGTCTGACC
	20	138	152	TTCTATCCTGATCCA
10	21	160	146	CAGATTTCTGGATCA
	22	153	167	GAAATCTGGTCCGTG
	23	174	161	AATTCAGCACGGAC
	24	168	182	CTGAATTCAAGCTTC
	25	186	175	CATGGAAGCTTG

PSTI-2, -10, -19 ja -20 (segmentti II)

15 fragmentit 12 - 25

	• 12	75	89	TACCGACGGCAACAC
	• 13	97	82	TCGGGTAAGTGTGCC
	14	90	105	TTACCCGAACGAATGC
	15	113	98	CACAGAACGCATTTCGT
	16	106	121	GTTCTGTGCTTCGAAA
20	17	129	114	TTTACGGTTTTTCGAAG
	18	122	137	ACCGTAAACGTCAGAC
	19	145	130	GGATAGAAGTCTGACC
	20	138	152	TTCTATCCTGATCCA
	21	160	146	CAGATTTCTGGATCA
	22	153	167	GAAATCTGGTCCGTG
	23	174	161	AATTCAGCACGGAC
	24	168	182	CTGAATTCAAGCTTC
25	25	186	175	CATGGAAGCTTG

PST-21 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

	1	7	1	GAGAGTC
30	2	1	13	GACTCTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	GATAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTATCGAATAC
	• 9	66	55	CGGACGGTATTC
35	• 10	61	74	CGTCCGGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

## Taulukko 3 (jatkoa)

PSTI-22 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

	1	7	1	GAGAGTC
5	2	1	13	GA <del>CT</del> CTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	GTAAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTTACATCTAC
	9	66	55	CGGGTTGTAGAT
10	10	61	74	AACCCGGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

PSTI-23 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

15	1	7	1	GAGAGTC
	2	1	13	GA <del>CT</del> CTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
	• 7	54	40	GAAAGTGCAACCGTT
20	• 8	48	60	CACTTTCATCTAC
	9	66	55	CGGGTTGTAGAT
	10	61	74	AACCCGGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

PSTI-24 (segmentti I)

fragmentit 1 - 11

25	1	7	1	GAGAGTC
	2	1	13	GA <del>CT</del> CTCTGGGTC
	3	23	8	TTAGCTTCACGACCCA
	4	14	30	GTGAAGCTAAATGCTAC
	5	39	24	CAGTTCGTTGTAGCAT
	6	31	47	AACGAACTGAACGGTTG
30	• 7	54	40	TTTAGTGCAACCGTT
	• 8	48	60	CACTAAAGAATAC
	• 9	66	55	CGGACGGTATTC
	• 10	61	74	CGTCCGGTTTGCGG
	11	81	67	GTCGGTACCGCAAAC

### Geenirakenteet

Kuvatut geenisekvenssit jaettiin oligonukleotidi-  
fragmenteiksi (kuvio 1). Nämä fragmentit limittyvät sel-  
västi, millä mahdollistetaan DNA-kaksoissäikeiden moitteet-  
5 ton rakentuminen entsyymaattisessa monikomponenttireaktios-  
sa.

PSTI-geenivarianttien rakentamisen perusstrategia  
edellyttää geenien rakentamista kahtena erillisenä seg-  
menttinä:

10 Segmentti I: fragmenteista 1 - 11; käsittää muut-  
tavat aminohapot asemissa 17 - 21

Segmentti II: fragmenteista 12 - 25; käsittää muut-  
tavat aminohapot asemissa 29 ja 32 sekä 36.

15 Taulukossa 3 esitetään eri segmenttejä I ja II ra-  
kennettaessa käytetyt oligonukleotidifragmenttiyhdistel-  
mät. Päägeenistä poikkeavat fragmentit on merkitty pis-  
teillä.

Ligatoimalla entsyymaattisesti toisiaan vastaavat  
segmenttiparit I ja II saadaan halutut täydelliset geenivari-  
20 antit. Ensin valmistettiin geenimultimeerejä sallimal-  
la myös litteiden päätyjen ligatoituminen segmenttien I  
5'-päätyihin ja tarttuvien päätyjen ligatoituminen seg-  
menttien II 3'-päätyihin. Monomeerisiä geenejä tuotettiin  
sitten pilkkomalla HincII:lla ja joko HindIII:lla,  
25 EcoRI:lla tai NcoI:llä.

### Menetelmät

#### Oligonukleotidifragmenttien kemiallinen synteesi

Kaikki tarvittavat oligodeoksiribonukleotidit syn-  
tetisoitiin tunnetulla fosfotriesterimenetelmällä käyttäen  
30 selluloosalevyjä segmenttien tukipintana (Frank et. al.  
Nucleic Acids Res. 11 (1983) 4365-4377). Ne puhdistettiin  
ioninvaihto-HPLC:n avulla Whatman-Partisil SAX-10 -kolon-  
nissa käyttäen eluoinnissa trietyyliammoniumfosfaattigra-  
dienttia (pH 6,3) 60-%:isessä formamidin vesiliuoksessa.



Oligonukleotidien ligatointi segmentti I- ja segmentti II -DNA-kaksoisäikeiksi

Ekvimolaariset määrät (50 pmol) kutakin oligonukleotidifragmenttia (ks. taulukko 3) yhdistettiin silikonoiduissa muoviputkissa (putki A: ylemmän säikeen muodostavat fragmentit, putki B: alemman säikeen muodostavat fragmentit). Fragmentit 1 ja 11 sekä 12 ja 25, joiden ei tullut fosforyloitua (esim. kaksoisjuosteiden päät) yhdistettiin erillisessä putkessa (putki C). Kuivattiin saatu materiaali. Putkien A ja B oligonukleotidejä fosforyloitiin 37 °C:ssa 30 minuutin ajan 5'-hydroksyyliipäätyihin nähden kolminkertaisella [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]APT-ylimäärällä (noin 2 Ci/mmol) 10  $\mu$ l:n reaktiutilavuusseoksissa, jotka sisälsivät 60 mM tris-HCl (pH 8), 6 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM DTE ja 2 yksikköä T4 PNK (polynukleotidikinaasia). Kvantitatiivisen fosforylaation jälkeen inaktivoitiin T4 PNK lämmittämällä putkia A ja B kahden minuutin ajan 95 °C:ssa ja siirrettiin sitten putkien sisällöt putkeen C. Lisättiin 10 mM DTE:tä, 0,2 mM ATP:tä ja kaksi yksikköä T4 DNA-ligaasia ja inkuboitiin seosta tunnin ajan 40 °C:ssa. Seoksen jäädyttyä 37 °C:seen lisättiin edelleen kaksi yksikköä T4 DNA-ligaasia ja jatkettiin inkubointia tunnin ajan 37 °C:ssa, sitten kolmen tunnin ajan 30 °C:ssa ja lopuksi yön yli 15 °C:ssa. Sitten seoksista otettiin näytteitä, jotka analysoitiin elektroforeettisesti 0,04 x 20 x 40 cm:n 10-%:isessa ei-denaturoivassa polyakryyliamidigeelissä (akryyliamidi:metyleenibisakryyliamidi 29:1, 50 mM Tris-boraatti, pH 8,3, 1 mM EDTA), joka pidettiin termostaatin avulla 25 °C:sena, jännitteen ollessa 1 000 voltia (BPB = bromifenolisininen kulkee 25 cm:n matkan). Geelielektroforeesinäytteet otettiin seokseen, joka sisälsi 0,05 % XC:tä, 0,05 % BPB:tä, 10 mM EDTA ja 4 M ureaa eikä niitä lämmitetty näyteapplikaatiota edeltävästi. Alkuperäisiä reaktioseoksia säilytettiin -20 °C:ssa, kunnes geelielektroforeesilla oli osoitettu halutun ketjupituuden omaavan tuotteen muodostuminen.

Sitten DNA-ligaasi inaktivoitiin lämmittämällä 15 minuutiksi 65 °C:seen. Ligatointituotteet eristettiin reaktioseoksista preparatiivisella geelielektroforeesilla käyttäen 1 mm:n paksuista geeliä ja muutoin edellä kuvatun kaltaisia reaktio-olosuhteita.

#### Täydellisten PSTI-geenivarianttien rakentaminen

Yhdistettiin 10 pmol vastaavia DNA-segmenttejä I ja II ja fosforyloitiin 30 minuutin ajan 37 °C:ssa 20 µl:n reaktiutilavuusseoksessa, joka sisälsi 60 pmol [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP:tä (200 Ci/mmol), 60 mM Tris-HCl, pH 8, 6 mM MgCl<sub>2</sub>:ta, 10 mM DTE:tä ja kaksi yksikköä T4 PNK:ta. Sitten lisättiin 2 µl 1 mM ATP:tä ja kaksi yksikköä T4 DNA-ligaasia, minkä jälkeen inkuboitiin 15 °C:ssa yön yli. Reaktioseos laimennettiin sitten 50 µl:ksi, jolloin seoksen puskuriominaisuuksista tuli restriktioentsyymeillä pilkkomiselle otolliset.

Esimerkiksi PSTI-geenivariantit

PSTI-1-Ala-32(-1A),

PSTI-3-Pro-32(-3P),

PSTI-6-Ser-32(-4A) ja

PSTI-5-Pro-32(5P)

rakennettiin edellä esitetyn menettelyn mukaan.

#### PSTI-geenivarianttien kloonaukset

##### Toimintaperiaate

Kuten edellä on kuvattu syntetisoitiin geenejä synteettisistä geenifragmenteista, jotka käsittivät aminohappojäännöksiä 17, 18, 19, 20, 21, 29 ja 32 koodaavissa asemassa eri sekvenssejä. Geenivarianttien PSTI-0 PSTI-24 (ks. taulukko 1) systemaattinen nimeäminen perustuu aminohappojäännöksiä 17 ja 29 välisen alueen erityiseen koodisekvenssiin, jota seuraa joko A (alaniinille), S (seriinille), G (glysiinille) tai P (proliinille) asemassa 32.

Geenirakenteet ovat siten suunnitellut, että segmentti I -variantit voidaan liittää segmentti II -variantteihin (esim. asema 32 -variantteihin) KpnI-kohdassa asemassa 72 - 76 suoritetun pilkkomisen jälkeen (kuvio 1).

Edelleen muita variantteja valmistettiin niiden geenifragmenttien paikkaohjautuvan mutageneesin avulla, jotka kloonattiin M13-bakteriofagivektoreissa synteettisiä nukleotidejä käyttämällä tai alusta lähtevän geenisynteesin avulla, kuten edellä on kuvattu.

#### Kloonaus

Litteän 5'-päädyn (aminopään koodipääty) ja HindIII-kohdan 3'-päädyssä käsittävien PSTI-varianttien (esim. PSTI-1A ja PSTI-3P) geenit kloonattiin restriktioentsyymeillä HincII ja HindIII sulatettuun plasmidiin pUC8 (pUCPSTI-1A ja pUC-PSTI-3P).

PSTI-variantit, jotka käsittivät lisäksi NH<sub>2</sub>-päädyssä metioniinjäännöksen (esim. Met<sup>1</sup>-PSTI-4A), kloonattiin vastaavalla tavalla pUC8-NcoI:een (joka sisältää HincII-kohtaan insertoituna NcoI-liittäjän CCCATGGG). pUC8NcoI:tä käsiteltiin NcoI-restriktioentsyymillä, käsiteltiin dNTP:illä DNA-PolI:n (suurikokoinen fragmentti) läsnä ollessa ja käsiteltiin edelleen HindIII:lla. Kloonaamalla PSTI-4A-variantin geeni tähän vektoriin rakennettiin uudelleen NcoI-restriktiokohta (pUC-Met-PSTI-4A).

Restriktioentsyymipilkkomisen, ligatoinnin, transformoinnin ja  $\beta$ -galaktosidaasiaktiivisuuden "insertaatioinaktivoitumisen" määrittämisen menetelmiä ovat kuvanneet T. Maniatis, EKG. Fritsch ja J. Sambrook kirjassa Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Publications, Cold Spring Harbor, 1982.

Tiettyjen varianttien lisäanalyysjä ja DNA-sekvenssointia silmällä pitäen kloonattiin HincII-HindIII-PSTI-fragmentit M13mp(-8, -9, -18 tai -19)vektoreihin noudattaen valmistajan (Boehringer, Mannheim) antamia ohjeita.

#### Muiden varianttien muodostaminen rekombinaatiotekniikan avulla

Restriktioendonukleaasi KpnI lohkaisee PSTI-geenin kaikki muodot ylemmässä säikeessä emäksen 76 jälkeen ja

alemmassa säikeessä emäksen 72 jälkeen, jolloin muodostuu 4 bp:n yksisäikeisiä 3'-ylijäämäpäättyjä (GTAC).

Lohkaisemalla pUC8-PSTI-hybridejä sekä KpnI:llä että ScaI:llä saadaan kaksi fragmenttia, joista toinen käsittää geenin 5'-päädyn, johon sisältyvät aminojäännöksen 17 - 21 muuttuvat sekvenssit ja toinen geenin 3'-päädyn, johon sisältyvät muuttuvat aminohappojäännökset asemissa 29 ja 32. Eri plasmideista peräisin olevien fragmenttien uudelleenligatoinnilla tuotetaan uusia pUC8PSTI-rekombinaatiovariantteja, joiden 5'- ja 3'-alueet ovat järjestäytyneet toisella tavalla (esim. lähtemällä PSTI-OP:stä ja PSTI-1A:sta voidaan tuottaa PSTI-0A ja PSTI-1P). Uudelleenjärjestäytyneiden pUC8-PSTI-varianttien lisääntymiskykyisenä isäntänä käytettiin Escherichia coli K-12-kantoja RR1ΔM15 ja DH1 (ATCC 31343 ja 33625).

Muiden uusien varianttien valmistus paikkaohjautuvan mutageneesin avulla

Lähtömateriaalina tässä mutatointimenettelyssä käytetään M13mp9-PSTI-klooneja, jotka valmistetaan pUC8-PSTI-varianteista peräisin olevia HincII-HindIII-PSTI-fragmentteja kaksisäikeiseen M13mp9-bakteriofagiin J. Messingin ja J. Vieran, Gene 19 (1982) 269-276, menetelmän mukaan. Eristettiin yksisäikeistä hybridibakteriofagia ja hybridisoitiin sitä bakteriofagin M13mp9 rev. lineaariseen negatiiviseen säikeeseen. Sitten hybridisoitiin mutaatiokohdassa uusien varianttien sekvenssin käsittäviä synteettisiä oligonukleotidejä tähän ns. aukkodupleksiin, minkä jälkeen muodostunutta hybridiä täytettiin polymeeraasi I:n (Klenow-fragmentti, Boehringer, Mannheim) avulla sekä ligatoitiin DNA-ligaasin avulla, jolloin muodostui mutaatiokohdassa poikkeavia emäspareja käsittävä suljettu, ympyrän muotoinen kaksoiskierre. Transformoimalla tätä DNA:ta epäparien korjausmekanismia vaillisessa E. coli-MutS-kannassa BMH 71 - 18 saadaan korkealla taajuudella M13mp9 rev.-PSTI-variantteja, jotka käsittävät epäilemättä synteetti-

sen mutageneesiprimerin myötävaikutuksesta kyseisen uuden sekvenssin ja jotka seuraavaksi valikoidaan *E. coli* su<sup>-</sup> (amber-suppressorimiinus) kannassa MK 30-3. Käytetty koejärjestely vastasi W. Kramerin et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), kuvaamaa. Tällä tavalla rakennettiin variantit PSTI-8P, -9P, -10P, -11P, -12P, -15P, -17P, -18P ja -19P.

#### DNA-sekvenssointi

Yksisäikeisten M13mp8-, M13mp9-, M13mp18- ja M13mp9 (rev.)-PSTI-molekyylien DNA-sekvenssointi suoritettiin käyttäen F. Sangerin et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 74 (1977) 5463-5467, kuvaamaa dideoksimenetelmää tai pGV451-rakenteiden kyseessä ollessa G. Volckaertin et al., Gene Analysis Techniques 1 (1984) 52-59, kemiallisen hajotusmenetelmän mukaan käyttäen spesifisiä ketjunpäätymerkkejä.

#### Kloonaus ilmaisuvektoreissa

PSTI-peptidivariantteja valmistettiin kloonamalla *E. coli* -eritysvektoreissa, jotka sisälsivät  $\alpha$ -amylaasin (*B. subtilis*) tai penisilliiniasylaasin (*E. coli*) signaalisekvenssit. Käyttämällä *E. coli* -eritysvektoreita ihmisen erittämän proteiinin, kuten PSTI:n ilmaisemiseksi, saavutetaan se etu, että fuusioitunut signaalipeptidi kuljettaa halutun geenituotteen sytoplasmamembraanin läpi solunulkoiseen tilaan, jolloin samanaikaisesti tapahtuu signaalipeptidin solutyöstö (G. Kreil, Ann. Rev. Biochem. 50 (1981) 317-348) ja aktiivisen PSTI:n vapautuminen joko valmiissa muodossa tai muutamasta aminohappojäännöksestä koostuvan liittopeptidin aminopäädysään sisältävän fuusiotuotteen muodossa.

T. Maniatis et al. ovat kirjassa Molecular Cloning, Cold Spring Harbor (1982) kuvanneet menetelmiä restriktioentsyymeillä pilkkomiseksi, 5'-ylijäämäpäätyjen täyttämiseksi dNTP:n avulla DNA-pol I:n (suurikokoinen fragmentti) läsnä ollessa, ketjun hajottamiseksi S<sub>1</sub>-nukleaasin avulla, DNA:n geelielektroforeesin suorittamiseksi sekä DNA-fragmenttien eristämiseksi ja ligatoinnin sekä transformoinnin suorittamiseksi.

$\alpha$ -amylaasieritysvektorien pCH 233 ja pCH 2331 rakentaminen

B. subtiliksen  $\alpha$ -amylaasisignaalisekvenssi saatiin Bacillus subtilis -kannasta DSM 704 (talletuslaitoksesta, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen) kloonamalla Sau3A:lla osittain sulatettua kromosomi-DNA:ta pMK 3:n BamHI-keskukseen (M.A. Sullivan et. al. Gene 29 (1984) 21-26). Yhtä klooneista, joka sisälsi  $\alpha$ -amylaasigeenin käsittävän 3 kb:n DNA-fragmentin, modifioitiin poistamalla osia  $\alpha$ -amylaasin rakennegeenistä pALK1:n saamiseksi (henkilökohtainen tiedonanto, Dr. M.A. Courtney, Rochesterin yliopisto, N.Y., Mikrobiologian laitos). pALK1:n DNA-sekvensseistä todettiin mahdollinen ribosomaalinen sitoutumiskohta (RBS) sekä 230 bp:n EcoRIBstEII-fragmentissa signaalisekvenssi, jonka homologia B. subtilis 1A289:n  $\alpha$ -amylaasiin nähden oli silmiinpistävä (vrt. DNA-sekvenssiä kuviossa 2 M. Yangin et. al., Nucleic Acids Res. (1983) 237-249, esittämään). Koska oli odotettavissa, että  $\alpha$ -amylaasisignaalisekvenssin prosessointi B. subtiliksessa tapahtuu aminohapossa asemassa 41 (ks. kuvio 2), suoritettiin signaalisekvenssin liittäminen PSTI-lukukehykseen BstEII-kohdassa. Tästä syystä eristettiin pALK1:stä (joka saatiin Dr. M.A. Courtneyltä, Rochester) 230 bp:n fragmentin, joka sisälsi mahdollisen Shine-Dalgano-kohdan sekä  $\alpha$ -amylaasin signaalisekvenssin (fragmentti A kuviossa 3A). Lukukehyksen joko Met-PSTI-1A:lle tai Met-PSTI-4A:lle sisältävä fragmentti B eristettiin pUC-Met-PSTI-1A:sta tai pUC-Met-PSTI-4A:sta (ks. kohti PSTI-geenivarianttien kloonauksen). Fragmentin A litteään 3'-päädyn ligatointi B:n litteään 5'-päätyyn liittää  $\alpha$ -amylaasisignaalisekvenssin lukukehyksen Met-PSTI-1A:n tai Met-PSTI-4A:n lukukehykseen, jolloin BstEII- ja NcoI-restriktiokohdat uudelleenrakentuvat (kuvio 3B). A-Bfragmentin oikealla suuntaamisella lac z-promoottoriin nähden (ks. kuvio 3) saatetaan PSTI-prekursorigeeni lac z<sup>po</sup>:n säätelyn alaiseksi lac z':n luku-

kehyyksen taakse, jonka viimeksi mainitun puolestaan tulisi päättyä TAAlopetuskodoniin (fragmentin A DNA-sekvenssiase-  
mat -58/-56, kuvio 2). Proteiinisynteesin saman mRNA:n  
5  $\alpha$ -amylaasin mahdolliseen Shine-Dalgano-kohtaan jälkeen  
noin 50 emästä alavirtaan lopetuskodonista asemasta -10  
(ks. kuvio 2).

pCH 233:lla (PSTI-1A) tai pCH 2331:llä (PSTI-4A)  
transformoidusta E. coli RR1AM15:stä saaduissa PSTI-tuot-  
10 teissa todettiin proteiinien puhdistuksen jälkeen amino-  
happosekvenssoinnilla 13 aminohapon liittyneen PSTI-mole-  
kyylin aminopäättyyn (ks. esimerkit 1 ja 3). Nämä ylimää-  
räiset aminohapot, joiden sekvenssi alkaa asn-ala-glu-thr  
..., todettiin identtisiksi  $\alpha$ -amylaasisignaalisekvenssin  
15 aminohappoihin nähden, jotka alkavat aminohaposta 32 ku-  
viossa 3B, mikä osoittaa, että PSTI-prekursorin proses-  
sointi E. coli -signaalipeptidaasin toimesta tapahtuu  
Bacillus  $\alpha$ -amylaasin signaalisekvenssissä aminohapposek-  
venssin ...pro-Ala<sub>29</sub>-ala-ala<sub>31</sub>↓ jälkeisessä osassa.

20 Penisilliiniasyylaasieritysvektoreiden pCH 2361, pCH  
2362 ja pCH 2363 rakentaminen

Toinen signaalisekvenssi PSTI-varianttien valmista-  
miseksi saatiin E. coli -penisilliiniasyylaasista (PENAC),  
joka on E. coli -kannan ATCC 11105 solunulkoinen entsyymi.

25 Penisilliiniasyylaasigeenin DNA-sekvenssin (W. Bruns  
et al., J. of Mol. and Appl. Genetics 3 (1985) 36-44) mu-  
kaisesti syntetisoitiin DNA-fragmentti, joka sisälsi Shi-  
ne-Dalgano-kohdan ja PENAC:in signaalisekvenssin, jota  
modifioitiin sijoittamalla Shine-Dalgano-kohdasta ylävir-  
30 taan EcoRI-kohta ja siitä alavirtaan EcoRV-kohta sekä  
BclI-kohta kuviossa 4 esitetyn sekvenssin asemaan 40, jol-  
loin alkuperäisessä PENAC-signaalisekvenssissä asemassa 9  
sijainnut aminohappovaliini saatiin muutetuksi metionii-  
niksi. PENAC-signaalisekvenssin prosessointikohtaan amino-  
35 happoasemaan 26 insertoitiin NheI-kohta. PENAC-DNA-frag-

mentti rakennettiin neljästä DNA-fragmentista (ketjut 1 -  
 4, kuvio 4). kuten kuvattiin PSTI-geeneille; tämä frag-  
 mentti kloonattiin pBR 322:een, jota oli pilkottu  
 EcoRI:lla ja NheI:llä (pPENAC 1, kuvio 5A). DNA-fragment-  
 5 tiketjujen 1 - 4 oligonukleotidisynteesi suoritettiin  
 Applied Biosystemsin DNA-syntetisaattorilla malli 380 val-  
 mistajan toimittamien ohjeiden mukaan. PENAC-signaalisek-  
 venssi saatettiin sitten lac z<sup>po</sup>:n säätelyn alaiseksi kloo-  
 naamalla pPENAC1:stä peräisin oleva EcoRI-BamHI-fragmentti  
 10 pUC8:aan (pCH 236 kuviossa 5A).

PSTI-5P:n ja PSTI-3P:n geenin sisältävien PENAC-il-  
 maisuvektoreiden (pCH 2361 ja vastaavasti pCH 2362) raken-  
 tamiseksi modifioitiin pCH 236:n NheI-keskusta (ks. kuvio  
 5A) ja pilkottiin sitä lisäksi tämän jälkeen HindIII:lla.  
 15 PSTI-5P:n (tai PSTI-3P:n) geenin ligatointi täten esikäsi-  
 teltyyn pCH 236:een liittää PENAC-signaalisekvenssin PSTI-  
 lukukehykseen, jolloin muodostuu ilmaisuvektori pCH 2361  
 (tai pCH 2362). Myös tässä yhteydessä tulisi, kuten edellä  
 pCH 233:lle kuvattiin, lac z' -lukukehyksen päättyä  
 20 PENAC:in Shine-Dalgano-kohtaa edeltävään TAG-kodoniin  
 (asemat 7 - 9 kuviossa 4).

Met-PSTI-4A:n (esimerkki 4) valmistamiseksi raken-  
 nettiin pCH 2363, jota varten pCH 236:ta esikäsiteltiin,  
 kuten edellä on kuvattu. Met-PSTI-4A:n geeni eristettiin  
 25 pCU-Met-PSTI-4A:sta (kuvio 5B).

pCH 233:n, 2331:n, 2361:n, 2362:n ja 2363:n trans-  
 formointi E. coli -kannassa RR1ΔM15 tai DH<sub>1</sub>

Transformoitaessa transformoitumiskykyisiä E. coli  
 DH<sub>1</sub>- tai RR1ΔM15-soluja pCH 233:lla, 2331:llä, 2361-2363-  
 30 :lla siirrostuksissa valikoivaan kasvualustaan (50 μg/ml  
 ampisilliiniä sisältävä agar-agar), yksisäikeisten pesäk-  
 keiden plasmidi-DNA:n restriktioanalyyyseissä ja minily-  
 saattien valmistuksessa käytettiin tavanomaisia menetelmiä  
 (T. Maniatis et al., Molecular Cloning - A Laboratory  
 35 Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982). Geenisegmentissä



tai ilmaisuvektorissa esiintyvien restriktiokohtien esiinseulonnan jälkeen määritettiin insertoidun DNA-fragmentin DNA-sekvenssi, kuten edellä kuvattiin synteettisille geeneille.

5                    pCH 233:lla, 2331:llä, 2361:llä, 2362:lla tai 2363:lla transformoidun E. coli -kannan RR1ΔM15 fermentointi ja indusointi

pCH 233:lla, 2331:llä, 2361:llä, 2362:lla tai 2363:lla transformoitua RR1ΔM15:tä viljeltiin yön yli kestävinä kasvatuksina. Kasvualusta sisälsi 3 % nautauutetta (Gibco), 1,5 % hiivauutetta (Gibco) ja 0,5 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tislatussa vedessä (pH 7,0) sekä μg:n/ml ampisilliiniä. Hyvän ilmastuksen saavuttamiseen kiinnitettiin huomiota, minkä vuoksi viljelmiä inkuboitiin 1 litran erlenmeyerkolveissa, 10                    jotka sisälsivät 100 ml kasvualustaa.

Kolveja ravisteltiin Kühner RC-6-U -ravistelulaitteessa 28 ja 37 °C:ssa ravistelutaajuudella 190 kpl/min.

PSTI-varianttien valmistamiseksi yön yli kasvaneita viljelmiä laimennettiin suhteessa 1:100 tuoreella 37 °C: 20                    :eisella kasvualustalla ja kasvatettiin sitten noin kolmen tunnin ajan, kunnes optinen tiheys 550 nm:n aallonpituudella oli 1,5. Lac-promoottorin indusointi suoritettiin lisäämällä viljelmiin 1 mM isopropyylitiogalaktodidia (Sigma). Fermentointia jatkettiin 20 tunnin ajan, kunnes 25                    optinen tiheys 550 nm:n aallonpituudella oli 4 - 6, minkä jälkeen solut otettiin talteen sentrifugoimalla 8 000 kierrosta/min kierrosnopeudella (10 min, 4 °C, laitteena Kontron Centrikon H-401, roottori A 6.14).

#### Inhibiittorien eristys ja luonnehdinta

30                    Entsyymit

Ihmisen leukosyyttielastaasi (HLE) ja sianhaimaelastaasi (PPE) hankittiin valmistajalta Elastin Products Company, Inc., P.O. Box 147, Pacific, Miss. 63609, USA.

Nauta-α-kymotrypsiini (CHT) hankittiin E. Merckiltä, 35                    Darmstadt.

### Substraatit

Substraatit MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA (HLE), Ac-Ala-Ala-Pro-Ala-pNA ja Suc-Ala-Ala-Ala-pNA (PPE) ja Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (CHT) hankittiin Bachemilta, Budendorf, Sveitsi.

5

### Kromatografiaväliaineet

Sephadex® G-25, Sephadex® G-50, Sepharose® 4B-C1 ja SP-Sephadex C-25 hankittiin valmistajalta Deutsche Pharmacia, Freiburg. Hydrofovinen hartsi LGP 4429 on Bayer AG:n, Leverkusen, oma tuote.

10

### Menetelmät

Kymotrypsiini immobilisoitiin Sepharose® 4B-C1:ään pelkistämällä Na[CHBH<sub>3</sub>]:lla kymotrypsiinistä muodostettua Schiffsin emästä, kun kantoaine oli ensin hapetettu natriumperjodaatilla (G.B. Royer et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 164 (1975) 478-484).

15

HPLC:ssä käytettiin soveltuvia kolonneja. Nämä on erikseen määritetty vastaavassa tekstiyhteydessä ja/tai oheisten kuvioiden selvitysten yhteydessä.

20

### Aminohapposekvenssin määrittäminen

Liutettiin noin 0,5 - 2 nmol proteiinia 30 µl:aan TFA:ta. Näyte siirrettiin lasikuitusuodattimelle, jota oli esikäsitelty 3 mg:lla Polybreniä. Sekvenssianalyysi suoritettiin Applied Biosystemsin (Inc., USA) kaasufaasiproteiinisekvenssorilla Hewickin mukaan (R.M. Hewick, M.W. Hunkapillar, L.E. Hood, W. Dreger, J. Biol. Chem. 256 (1981) 7990-7997). Kussakin vaiheessa vapautuneet aminohappofenyylitiohydantoiini johdannaiset analysoitiin käyttämällä syaani-HPLC-kolonna (DuPont) ja Beyreutherin kuvaamaa erotysjärjestelyä (K. Beyreuther, B. Biesler, J. Bowens, R. Dildrop, K. Neuffer, K. Stüber, S. Zais, R. Ehring, P. Zabel, Modern Methods in Protein Chemistry, Walter de Gruyter & Co., Berliini, 1983, s. 303-325). Käytettiin Watersin HPLC-järjestelyä, joka käsitti M 520 -pumpun, WISP 710B -autoinjektorin, LC-spektrofotometrin tyyppi M 481 ja SHIMADZU-integraattorin tyyppi CR-3A.

25

30

35

### Happohydrolyysi ja aminohappoanalyysi

Mitataan noin 1 nmol proteiinia pyrex-lasiseen koeputkeen ja lisätään 200  $\mu$ l 6M HCl, joka sisältää 0,05 % 2-merkaptoetanolia (I.T. Potts Jr. Anal. Biochem. 131 (1969) 1-15). Koeputkisisällöt sulatetaan vakuuissa ja inkuboidaan 42 tunnin ajan 110 °C:ssa. Hydrolysaatit kuivataan nopeasti, liuotetaan uudelleen 150  $\mu$ l:aan 0,2M natriumsitraattipuskuria, pH 2,2 ja suodatetaan. Aminohappoanalyysit suoritettiin Biotronic LC 5000 -aminohappoanalyysaattorilla, joka oli varustettu fluoresenssidetektorilla ja SHIMADZU CR-2A -integraattorilla. Aminohapot saatettiin reagoimaan o-ftaalialdehydin kanssa ja kvantitoitiin sitten oleellisesti Bensonin kuvaaman menetelmän mukaan (J.R. Benson, P.E. Hare, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 619-622).

### Entsyymianalyysit ja inhibiiovaikutuksen määritykset viljelmäsuodoksista

Viljelmäsuodoksia käsiteltiin seuraavasti:

Lisättiin 10  $\mu$ l Tween 80 -liuosta (0,5 %) ja 50  $\mu$ l perkloorihappoa (70 %) 1 ml:aan viljelmäsuodosta. 20 minuutin kuluttua kyseiset näytteet sentrifugoitiin ja neutraloitiin kirkkaat supernatantit lisäämällä 225  $\mu$ l kyllästettyä Tris-emäsluosta. Näistä liuoksista otettiin määräsuuruisia näytteitä inhibiiovaikutuksen määrittämiseksi.

Entsyymimäärityksissä käytetyt olosuhteet on esitetty taulukossa 4. Yleensä ottaen näytteitä laimennettiin sopivalla puskurivilavuudella, minkä jälkeen lisättiin entsyymi. Esi-inkuboinnin jälkeen lisättiin substraatti (substraatit oli liuotettu DMSO:hon 0,1M:n pitoisuudeksi sekä laimennettu puskurilla perusliuoksen pitoisuuteen). p-nitroanaliinin vapautuminen substraateista määritettiin 405 nm:n aallonpituudella joko jatkuvasti tai reaktion pysäytyksen etikkahappoa lisäämällä jälkeen. 100 %:n luke-ma annettiin niille näytteille, joihin ei ollut lisätty inhibiittoreita. Prosentuaalinen inhibiio laskettiin seuraavasta kaavasta:

$$\text{inhibitio-\%} = 100 \times \left( 1 - \frac{\text{optinen tiheys, kun inhi-} \\ \text{biittoreita läsnä}}{\text{optinen tiheys, kun inhi-} \\ \text{biittoreita ei läsnä}} \right)$$

5

Absoluuttiset inhibiittorimäärät pystyttiin laske-  
maan kalibrointikäyrien avulla vasta sitten, kun käytet-  
tävässä oli pieniä määriä puhtaita yhdisteitä.

10 Tämän hakemusjulkaisun esimerkeissä 3 ja 6 käytetyt  
mikro-organismit talletettiin talletuslaitokseen National  
Collection of Industrial Bacteria (NCIB), Torry Research  
Station, P.O. Box 31, 135 Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG,  
Skotlanti, Englanti, talletusnumeroilla NCIB 12 365 ja  
15 NCIB 12 364.

#### Esimerkki 1

Asn<sup>13</sup>-Ala<sup>12</sup>-Glu<sup>11</sup>-Thr<sup>10</sup>-Ala<sup>9</sup>-His<sup>8</sup>-Lys<sup>7</sup>-Ser<sup>6</sup>-Asn<sup>5</sup>-Glu<sup>4</sup>-  
Val<sup>3</sup>-Thr<sup>2</sup>-Met<sup>1</sup>-Leu<sup>18</sup>-Glu<sup>19</sup>-Arg<sup>21</sup>-Ala<sup>32</sup>-PSTI:n (PSTI-4A-  
minifuusiotuotteen eristys

20 Käsiteltiin 10 litraa RR1ΔM15/pCH 2331:n fermentaa-  
tiolietettä 350 ml:lla perkloorihappoa (70-%:ista). Sakka  
poistettiin sentrifugoimalla. Supernatantti neutraloitiin  
8N KOH-liuoksella. KClO<sub>4</sub>-sakka erotettiin suodattamalla  
büchnersuppilolla imun avulla seisotuksen 4 °C:ssa jäl-  
25 keen.

Suodos suodatettiin kymotrypsiini-Sepharose-4B-Cl  
-konjugaattigeelikerroksen (7 x 9 cm) läpi 4 °C:ssa. Gee-  
liä pestiin vedellä, kunnes eluaatin ekstinktio 280 nm:n  
aallonpituudella lähestyi nollaa ja sitten 500 ml:lla 0,2M  
30 asetaattipuskuria (pH 5) ja 500 ml:lla vettä. Lopuksi gee-  
liä eluoiitiin 0,2M etikkahapolla, jonka pH oli HCl:llä  
säädetty 2,0:aan. Eluutioprofiili on esitetty kuviossa 6.  
Aktiiviset fraktiot (määritettyinä leukosyyttielastaasin  
inhiboitumismäärityksellä) yhdistettiin, pH säädettiin  
35 neljään lisäämällä kiinteää natriumasetaattia sekä konsen-  
troitiin pyöröhaihduttimella. Lopuksi suolat ja vähäiset  
määrät epäpuhtauksia poistettiin preparatiivisen HPLC:n

avulla RP-318-kolonnia käyttäen. Eluutioprofiili on esitetty kuviossa 7. Kunkin fraktion puhtausaste määritettiin analyyttisen HPLC:n avulla.

5 Näiden tuloksien mukaisesti valmistettiin fraktioyhdistelmät fraktioista 42 - 44, 45 - 46 ja 47 - 49, jotka kylmäkuivattuina tuottivat 6, 12 ja vastaavasti 6 mg tuotetta. Korkeimpaan puhtausasteeseen päästiin keskifraktioissa, diagrammi näiden alayttisestä HPLC-ajosta on esitetty kuviossa 8.

10 Tiedot aminohappokoostumuksesta ja sekvenssianalyyseistä sekä inhibitiospektri on esitetty taulukoissa 5 - 7.

#### Esimerkki 2

15 Leu<sup>18</sup>-Glu<sup>19</sup>-Arg<sup>21</sup>-Ala<sup>32</sup>-PSTI:n (PSTI-4A:n) valmistus minifuusioproteiinista BrCN:n avulla pilkkomalla

20 Liuotettiin 2,93 mg (0,46 µmol) PSTI-4A-minifuusiotuotetta (esimerkki 1) 1 ml:aan 70-%:ista muurahaishappoa. Lohkaisu suoritettiin lisäämällä 3 mg bromisyaania ja inkuboimalla 18 tuntia huoneen lämpötilassa typpiilmakehässä sekä pimeässä. Reaktio pysäytettiin laimentamalla seosta 10 ml:lla vettä. Vesi sekä haihtuvat sivutuotteet poistettiin kylmäkuivaamalla. Leu<sup>18</sup>-Glu<sup>19</sup>-Arg<sup>21</sup>-Ala<sup>32</sup>-PSTI (PSTI-4A) erotettiin sivutuotteista ja lohkeamattomasta fuusioproteiinista geelikromatografian avulla käyttäen Sephadex<sup>®</sup>  
25 G50 (Superfine) -kolonnia (2,5 x 90 cm) 1-%:isella muurahaishapolla eluoiden. Fraktiot yhdistettiin niiden retentioaikojen hienohuokoisessa Biorad RP-318 -kolonnissa (4,6 x 250 mm) perusteella; liuos A: 0,1-%:inen TFA, liuos B: 0,1-%:inen TFA/60-%:inen asetonitriili; virtausnopeus 1  
30 ml/min; huoneen lämpötila; fraktioiden toteaminen 210 nm:n aallonpituudella; gradientti 0 - 60 % liuosta B.

35 Fraktiot kylmäkuivattiin ja niitä puhdistettiin toistamiseen suoritettuna kromatografian avulla käyttäen samaa kolonnia ja samoja olosuhteita. Aktiiviset fraktiot kerättiin talteen ja kylmäkuivattiin. Puhtaus varmistet-

tiin suorittamalla Leu<sup>18</sup>-Glu<sup>19</sup>-Arg<sup>21</sup>-Ala<sup>32</sup>-PSTI:n (PSTI-4A:n) analyyttinen HPLC-ajo, kuten on kuvattu esimerkissä 1. Inhibiittoria karakterisoitiin aminohappoanalyysin, N-päätysekvenssoinnin sekä HPLC:n ja elastaasiinhibitiomäärityksen avulla (taulukot 5 - 7).

Esimerkki 3

Asn<sup>-13</sup>-Als<sup>-12</sup>-Glu<sup>-11</sup>-Thr<sup>-10</sup>-Ala<sup>-9</sup>-His<sup>-8</sup>-Lys<sup>-7</sup>-Ser<sup>-6</sup>-Asn<sup>-5</sup>-Glu<sup>-4</sup>-Val<sup>-3</sup>-Thr<sup>-2</sup>-Met<sup>-1</sup>, Leu<sup>18</sup>-Ala<sup>32</sup>-PSTI:n (PSTI-1A-minifuusiotuotteen) eristys

Käsiteltiin neljää litraa RR1ΔM15/pCH 233:n fermentaatiolietettä 120 ml:lla perkloorihappoa (70-%:ista) ja poistettiin muodostunut sakka sentrifugoimalla (30 min, 4 °C, 4 000 kierr./min, Beckman J-6). Supernatantin pH säädettiin 8N NaOH-liuoksella 8,6:een ja suodatettiin supernatantti sitten kymotrypsiini-Sepharose-4B-Cl-konjugaattikerroksen (8 x 10 cm) läpi. Geeliä pestiin 0,2M Tris-HCl-puskurilla (pH 8,6), kunnes suodoksen ekstinktio 280 nm:n aallonpituudella palautui perustasolle. Tämän jälkeen geeliä eluoiitiin toisiaan seuraten vedellä ja 0,1M etikkahapolla, jonka pH oli HCl:llä säädetty kahteen.

Inhibiittoriaktiivisuutta sisältävät fraktiot (tunnistettuina leukosyyttielastaasin avulla) yhdistettiin, pH säädettiin 8N NaOH-liuoksella 2,7:ään ja fraktiot kaadettiin SP-Sephadex C-25 -kolonniin (2,5 x 35 cm), joka oli edeltä käsin tasapainotettu 0,15-%:isellä trifluorietikkahapolla (jonka pH oli säädetty 2,7:ään NaOH-liuoksella).

Kolonne pestiin lähtöpuskurilla ja sitä eluoiitiin sitten käyttäen lineaarista 0 - 1M NaCl-gradienttia lähtöpuskurissa. Yhdistettävät fraktiot valittiin inhibiittoriaktiivisuuden ja analyyttisen HPLC-ajon (RP-318, Bio-rad) perusteella. Yhdistetyt fraktiot konsentroitiin ultrasuodattamalla käyttäen UM2-kalvoa (Amicon) ja lopullinen puhdistus suoritettiin preparatiivisella HPLC-kromatografialla käyttäen RP-318-kolonnia (gradientti 0 - 60 % asetonitriiliä 0,15-%:isessä trifluorietikkahapossa 60 mi-

nuutin aikana). Saatiin kaksi fraktiota, jotka kylmäkuivattiin ja saatiin 8,7 mg homogeenistä tuotetta sekä 1,9 mg vähäisiä määriä epäpuhtauksia sisältävää tuotetta. Analyttiset tiedot (aminohappoanalyysi, sekvenssianalyysi ja inhibiatiovaikutus) on esitetty taulukoissa 5 - 7.

Suoritettiin PSTI-1A-minifuusioproteiinin pilkkominen kromisyaanilla, kuten on kuvattu esimerkissä 2 ja saatiin Leu<sup>18</sup>-Ala<sup>32</sup>-PSTI (PSTI-1A)

Esimerkki 4

10 Met<sup>-1</sup>-Leu<sup>18</sup>-Glu<sup>19</sup>-Arg<sup>21</sup>-Ala<sup>32</sup>-PSTI:n (Met-PSTI-4A:n) eristys

Käsiteltiin yhtä litraa RR1ΔM15/pCH 2363:n fermentaatiolietettä perkloorihapolla, sentrifugoitiin ja neutraloitiin, kuten on kuvattu esimerkissä 1 sekä kaadettiin saatu liuos lopuksi kymotrypsiini-Sepharose-4B-Cl-konjugaattikolonniin (2,5 x 10 cm). Geeliä pestiin vedellä, asetaattipuskurilla ja vedellä, kuten on kuvattu esimerkissä 1. Inhibiittorin desorptio suoritettiin eluoimalla 0,2M etikkahapolla, pH 2 (säädetty HCl-liuoksella). Yhdistettiin inhibiittoriaktiivisuutta sisältävät fraktiot, säädettiin pH neljään lisäämällä NaOH-liuosta ja konsentroitiin pyöröhaihduttimessa 5 ml:ksi. Lopullinen puhdistus suoritettiin preparatiivisella HPLC:llä käyttäen RP-318-kolonnia ja 0 - 60 % asetonitriiligradianttia 0,15-%:isessa trifluorietikkahapossa. Kylmäkuivaamalla yhdistetyt aktiivisuutta sisältävät fraktiot saatiin 1,8 mg tuotetta. Muut tiedot (aminohappokoostumus, sekvenssianalyysi ja inhibiatiovaikutus) on esitetty taulukoissa 5 - 7.

Esimerkki 5 (vertailu)

30 Tyr<sup>18</sup>-Glu<sup>19</sup>-Arg<sup>21</sup>-PSTI:n (PSTI-3P:n) eristys

Käsiteltiin 750 ml RR1ΔM15/pCH 2362:n fermentaatiolietettä 25 ml:lla perkloorihappoa ja sentrifugoitiin 30 minuutin kuluttua. Supernatantti neutraloitiin lisäämällä 4N KOH-liuosta, muodostunut KClO<sub>4</sub> poistettiin kuuden tunnin kuluttua suodattamalla. Suodos kaadettiin kymotrypsiini-

Sepharose-4B-Cl-kolonnein (2,5 x 7 cm), jota sitten pestiin vedellä ja 0,2M etikkahapolla. Inhibiittorin desorptio suoritettiin 0,2M etikkahapolla, jonka pH oli säädetty 1,8:aan HCl:llä. Aktiiviset fraktiot yhdistettiin, pH sää-  
 5 dettiin 3,5:een NaOH-liuoksella ja konsentroidiin pyörö-  
 haihduttimessa. Vähäinen sakka poistettiin sentrifugoimal-  
 la ja suoritettiin supernatantilla preparatiivinen HPLC-  
 ajo RP-318-kolonnissa. Kylmäkuivaamalla aktiiviset frak-  
 tiot saatiin noin 0,8 mg inhibiittoria, joka analyyttisen  
 10 HPLC:n perusteella oli homogeenista. analyttiset tiedot  
 (aminohappoanalyysi, sekvenssianalyysi ja inhibitiivaiku-  
 tus) on esitetty taulukoissa 5 - 7.

#### Esimerkki 6

Val<sup>18</sup>-Glu<sup>19</sup>-Arg<sup>21</sup>-PSTI:n (PSTI-5P:n) eristys

15 3 litraan RR1ΔM15/pCH 2361:n fermentaatiolietettä  
 lisättiin 100 ml:aan perkloorihappoa (70-%:ista). 30 mi-  
 nuutin kuluttua muodostunut sakka suodatettiin pois ja  
 säädettiin supernatantin pH 7:ään 8N NaOH-liuoksella. Suo-  
 dos kaadettiin sitten hydrofobiselle hartsikerrokselle  
 20 (Lewapol LGP 4429, Bayer AG; halkaisija 3 cm, kerroksen  
 paksuus 40 cm), joka oli edeltä käsin pesty 0,1N HCl:llä,  
 metanolilla ja vedellä. Hartsi pestiin vedellä ja sitä  
 eluoitiin sitten lineaarisella 0 - 70 % metanoligradien-  
 tilla. Määritettiin kunkin fraktion inhibiittoriaktiivi-  
 25 suus (leukosyyttielastaasin inhibitiomääritys metanolin  
 poiston haihduttamalla jälkeen). Aktiiviset fraktiot yh-  
 distettiin ja konsentroidiin vakuumihaihdutuksella. Kon-  
 sentraatti tehtiin happamaksi pH 2,7:ään trifluorietikka-  
 hapolla ja kaadettiin SP-Sephadex-25-kolonnein (2,5 x 10  
 30 cm), joka oli edeltä käsin tasapainotettu 0,15-%:isella  
 trifluorietikkahapolla (pH 2,7, säädetty NaOH:lla).

Kolonnia eluoitiin sitten lineaarisella 0 - 1M  
 NaCl-gradientilla lähtöpuskurissa. Inhibiittoriaktiivi-  
 suutta sisältävät fraktiot yhdistettiin, neutraloitiin,  
 35 konsentroidiin ja poistettiin suolat suodattamalla Sepha-



dex G-25:llä käyttäen 0,01M fosfaattipuskuria, pH 7,0. Aktiivisten fraktioiden pH säädettiin 2,7:ään ja niillä suoritettiin toistamiseen kromatografia-ajo SP-Sephadex C-25 -kolonnissa käyttäen lineaarista 0,1 - 0,5 M NaCl-gradienttia, pH 2,7.

5 Aktiivisten fraktioiden pH säädettiin 4,0:aan, kon-  
sentroititiin ja puhdistettiin niitä edelleen suorittamalla  
preparatiivinen kromatografia-ajo RP-318-kolonnissa. Tämä  
vaihe toistettiin kerran. Lopullinen puhdistus suoritet-  
10 tiin preparatiivisen HPLC-ajon avulla Pharmacia Mono-S-  
kolonnissa ja tätä seuraavan toistamiseen suoritettun kro-  
matografia-ajon RP-318-kolonnissa avulla (kuvio 9). Puh-  
distettun tuotteen analyttiset HPLC-diagrammit on esitetty  
kuviossa 10. Muut analyttiset tiedot (aminohappokoostu-  
15 mus, sekvenssi, inhibiatiovaikutus) on esitetty taulukoissa  
5 - 7.

Taulukko 4

	Leukosyytti-elästaasi (ihminen)	Haimaelastaasi (sika)	$\alpha$ -kymotrypsiini (nauta)
Puskuri	0,2 M Tris, pH 8 + 0,1 % Tween 80	0,2 M Tris, pH 8 + 0,1 % Tween 80 + 0,05 % Na-atsidi	0,2 M Tris, pH 8 + 0,05 % Tween 80
Kokonaistilavuus (substraatin lisäämisen jälkeen)	0,65 ml	0,65 ml	0,60 ml
Entsyytimäärä määrittystä kohden	50 ng	25 - 50 ng	50 ng
Esi-inkubointiaika Lämpötila	30 min huoneen lämpötila	30 - 150 min huoneen lämpötila	30 min huoneen lämpötila
Substraatti: Koostumus Kantaliuosmäärä määrittystä kohden Viite	MeO-Suc-Ala-Ala- Pro-Val-pNA 0,065 M 0,1 ml 1)	Ac-Ala-Ala- Pro-Ala-pNA 0,065 M 0,1 ml 2)	Suc-Ala-Ala- Pro-Phe-pNA 0,005 M 0,04 ml 3)
Inkubointilämpötila	30°C	30°C	Huoneen lämpötila

1) Nakjima, K., Powers, J.C., Castillo, M.J., Ashe, B.M., Zimmerman, M., J. Biol. Chem. 254 (1979) 4027

2) Zimmerman, M., Ashe, B.M., Biochim. Biophys. Acta 480 (1977), 241

3) DelMar, E.G., Largman, C., Brodrick, J.W., Geokas, M.C., Anal. Biochem. 92 (1979) 316

Taulukko 5 Eri inhibiittoreiden aminohappoanalyysit

Amino- happo	PSTI-4A	PSTI-4A (minifuu- siotuote)	PSTI-1A	PSTI-1A (minifuusio- tuote)	Met-PSTI-4A	PSTI-5P	PSTI-3P
Asp	6,45 (7)	8,46 (9)	8,09 (8)	9,95 (10)	6,91 (7)	7,23 (7)	6,70 (7)
Thr	3,66 (4)	5,48 (6)	4,00 (4)	5,50 (6)	3,71 (4)	3,67 (4)	3,61 (4)
Ser	2,83 (3)	3,70 (4)	2,79 (3)	3,82 (4)	3,24 (3)	3,38 (3)	2,47 (3)
Glu	6,83 (7)	9,45 (9)	6,65 (6)	8,61 (8)	7,09 (7)	7,79 (7)	7,14 (7)
Gly	4,91 (5)	5,50 (5)	5,37 (5)	5,75 (5)	5,52 (5)	5,55 (5)	4,94 (5)
Ala	2,08 (2)	3,70 (4)	2,20 (2)	4,0 (4)	2,21 (2)	1,19 (1)	1,06 (1)
Val	2,08 (2)	3,02 (3)	2,00 (2)	3,19 (3)	2,00 (2)	2,83 (3)	1,92 (2)
Met	- (0)	0,88 (1)	-	0,85 (1)	1,14 (1)	-	- (0)
Ile	1,80 (2)	1,78 (2)	2,73 (3)	3,01 (3)	1,86 (2)	1,91 (2)	1,70 (2)
Leu	4,60 (5)	3,13 (5)	4,62 (5)	5,03 (5)	5,26 (5)	4,00 (4)	3,47 (4)
Tyr	2,66 (3)	3,13 (3)	2,95 (3)	2,65 (3)	2,50 (3)	3,01 (3)	3,50 (4)
Phe	1,00 (1)	1,14 (1)	1,22 (1)	1,25 (1)	0,76 (1)	1,35 (1)	1,00 (1)
His	- (0)	0,88 (1)	-	1,15 (1)	-	-	- (0)
Lys	2,91 (3)	4,25 (4)	2,84 (3)	3,65 (4)	3,42 (3)	3,21 (3)	2,67 (3)
Arg	3,60 (4)	4,11 (4)	3,20 (3)	3,22 (3)	3,80 (4)	4,22 (4)	3,60 (4)

Aminohapot määritettiin erotuksen jälkeen muodostamalla niistä o-ftaaliialdehydi johdannaiset.  
Jäännöksiä Cys ja Pro ei määritetty.

Taulukko 6 Taulukossa 5 kuvatun mukaisten PSTI-varianttien N-päätyaminohapposekvenssianalyysit

Johdan- nainen	A s e m a																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
PSTI-4A	Asp	Ser	Leu	Gly	Arg	Glu	Ala	Lys	Cys	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Gly	Cys	Thr	Leu	Glu	Tyr	Arg	Pro
PSTI-4A minifuu- siotuote	Asn	Ala	Glu	Thr	Ala	His	Lys	Ser	Asn	Glu	Val	Thr	Met	Asp	Ser	Leu	Gly	Arg	Glu	Ala	Lys	Cys
PSTI-1A	Asp	Ser	Leu	Gly	Arg	Glu	Ala	Lys	Cys	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Gly	Cys	Thr	Leu	Ile	Thr	Asn	Pro
PSTI-1A minifuu- siotuote	Asn	Ala	Glu	Thr	Ala	His	Lys	Ser	Asn	Glu	Val	Thr	Met	Asp	Ser	Leu	Gly	Arg	Glu	Ala	Lys	Cys
Met-1- PSTI-4A	Met	Asp	Ser	Leu	Gly	Arg	Glu	Ala	Lys	Cys	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Gly	Cys	Thr	Leu	Glu	Tyr	Arg
PSTI-5P	Asp	Ser	Leu	Gly	Arg	Glu	Ala	Lys	Cys	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Gly	Cys	Thr	Val	Glu	Tyr	Arg	Pro
PSTI-3P	Asp	Ser	Leu	Gly	Arg	Glu	Ala	Lys	Cys	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Gly	Cys	Thr	Tyr	Glu	Tyr	Arg	Pro

**Taulukko 7** Keksinnön mukaisten PSTI-varianttien inhibiatiovaikutus. Esitetyt inhibiittorimäärät tuottavat 50-%:isen inhibition

Entsyymi	$\alpha$ -kymotrypsiini (nauta) (50 ng/määritys)	Granulosyöttielastaasi (ihminen) (120 ng/määritys)	Haimaelastaasi (sika) (500 ng/määritys)
<b>PSTI-4A</b> -minifuusio- tuote (esim. 1)	6 ng	15 ng	68 ng
<b>PSTI-4A</b> (esim. 2)	7 ng	17 ng	75 ng
<b>PSTI-1A</b> (esim. 3)	100 ng	18 ng	1200 ng
<b>Met-PSTI-4A</b> (esim. 4)	8 ng	16 ng	73 ng
<b>PSTI-3P</b> (esim. 6)	7 ng	> 5000 ng	-
<b>PSTI-5P</b>	100 ng	15 ng	70 ng

### Kuvioiden selitys

Kuvio 1: PSTI-päägeenin nukleotidisekvenssi ja vastaava aminohapposekvenssi. Geeniä rakennettaessa käytetyt synteettiset oligonukleotidit on merkitty sulkeiden ja järjestysnumeroiden avulla. Geenin jakautuminen segmenttiin I (ensimmäinen osa) ja segmenttiin II (jälkimmäinen osa) on osoitettu katkoviivalla.

Kuvio 2: pALK1:n 230 bp:n EcoRI-BstEII-fragmentin DNA-sekvenssi, joka käsittää mahdollisen Shine-Dalgano-kohdan (SD) asemassa -10 sekä x-amylaasin signaalisekvenssin alkaen asemasta 1. Eksoentsyymien mahdollinen prosessointikohta on aminohappojäännöksen 41 kohdalla.

Kuvio 3A: Fragmentti A eristettiin pALK1:stä sulattamalla plasmidia BstEII:lla, minkä jälkeen sitä täytettiin dNTP:llä DNAPolI:n läsnä ollessa (suurikokoinen fragmentti). DNA:ta käsiteltiin fenolilla, saostettiin se etanolilla ja pilkottiin lopuksi EcoRI:llä, 230 bp:n DNA-fragmentti (A) eristettiin elektroforeettisen erotuksen jälkeen 2-%:isesta agarosigeelistä. 180 bp:n fragmentti B eristettiin vastaavalla tavalla pUC-Met-PSTI-1A:sta (tai pCH 2331:n rakentamiseksi pUC-Met-PSTI-4A:sta) pilkkomalla restriktioentsyymillä NcoI, täyttämällä dNTP:llä, saostamalla etanolilla ja lopuksi pilkkomalla EcoRI:llä. Sekä fragmentti A että fragmentti B ligatoitiin EcoRI:lla pilkottuun pUC8:aan.

Kuvio 3B: Esitetään Met-PSTI-1A:lle tai -4A:lle sekvenssi  $\alpha$ -amylaasisignaalsekvenssin (fragmentti A) ja Met-PSTI-geenin (fragmentti B) välisessä sitoutumiskohdassa. E. colissa signaalisekvenssin prosessointi tapahtuu aminohappojäännöksen 31 ja 32 välistä (ks. esimerkki 1).

Kuvio 4: Esitetään synteettinen EcoRI-NheI-DNA-fragmentti (PENAC), joka käsittää mahdollisen Shine-Dalgano-kohdan (asemassa 10) sekä E. coli penisilliiniasylaasin modifioidun signaalisekvenssin prosessointikohtineen aminohappojäännöksen Ala<sub>26</sub> kohdalla.

Kuvio 5A: Synteettinen PENAC-sekvenssi (96 bp:n EcoRI-NheI-fragmentti, vrt. kuvio 4) kloonattiin pBR322:een, jota oli pilkottu EcoRI:llä ja NheI:llä ja saatiin pPENAC1. pPENAC1:tä pilkottiin EcoRI:llä ja BamHI:llä; saatava Shine-Dalgano-kohdan sekä PENAC-signaali-

5 : sekvenssin käsittävä 250 bp:n DNA-fragmentti ligatoitiin EcoRI:llä ja BamHI:llä pilkottuun pUC8:aan ja saatiin pCH 236.

pCH 2361:n (tai pCH 2362:n) rakentamiseksi pCH

10 : 236:ta pilkottiin NheI:llä ja täytettiin dCTP:llä ja dTTP:llä DNAPolI:n (suurikokoinen fragmentti) läsnä ollessa. DNA:ta käsiteltiin fenolilla ja saostettiin se etanolilla; suoritettiin entsyymaattinen  $S_1$ -nukleaasireaktio litteäpäätyisen kodonin tuottamiseksi Ala<sub>26</sub>:lle signaalipeptidaasin pilkkomiskohtaan PENAC-signaalisekvenssissä (vrt. kuvio 4). DNA:n saostamisen jälkeen pCH 236:ta pilkottiin edelleen HindIII:lla ja eristettiin vektori elektroforeettisen erotuksen jälkeen 0,8-%:isesta agarosigeelistä.

15 :

PSTI-5P:n geeni saatiin pUC-PSTI-5P:stä pilkkomalla

20 : restriktioentsyymeillä HincII ja HindIII; saatava 180 bp:n fragmentti eristettiin elektroforeettisen erotuksen jälkeen 2-%:ista agarosigeelistä. PSTI-3P:n geeni eristettiin vastaavalla tavalla pUC-PSTI-3P:stä. pUC-PSTI5P:stä (tai pUC-PSTI-3P:stä) eristetyn 180 bp:n HincII-HindIII-

25 : fragmentin ligatointi pCH 236:een tuotti pCH 2361:n (tai pCH 2362:n).

Kuvio 5B: pCH 236:ta sulatettiin NheI:llä ja täytettiin dCTP:llä DNAPolI:n (suurikokoinen fragmentti) läsnä ollessa. DNA:n saostamisen jälkeen suoritettiin entsyymaattinen käsittely  $S_1$ -nukleaasilla litteän päädyn muodostamiseksi. Vektoria sulatettiin edelleen HindIII:lla ja eristettiin se elektroforeettisen erotuksen jälkeen 0,8-%:isesta agarosigeelistä. Met-PSTI-4A:n geeni saatiin pUC-Met-PSTI-4A:sta pilkkomalla restriktioentsyymillä NcoI ja sitä täytettiin dNTP:llä. Etanolisaostuksen jälkeen DNA:ta

30 :

35 :

pilkottiin edelleen HindIII:lla ja eristettiin 180 bp:n fragmentti elektroforeettisen erotuksen jälkeen 2-%:isesta agarosigeelistä.

Kuvio 6: PSTI-4A-minifuusiotuotteen eristys affiniteetikromatografialla käyttämällä immobilisoitua kymotrypsiiniä sisältävää kolonnia (7 x 9 cm) ja 4 °C:n lämpötilaa. Kerättiin tilavuudeltaan 11 ml:n suuruisia fraktioita. Abskissa-akselilla ovat koeputkien järjestysnumerot. Ordinaatta-akselille on merkitty vastaavat ekstinktiot 280 nm:n aallonpituudella. Kolonnia eluointiin vedellä (fraktioon 40 asti) sekä sitten 0,2M asetaattipuskurilla pH 5,0 (fraktioon 70 asti) ja tislattulla vedellä (fraktioon 85 asti). Lopullinen desorptio aikaansaatii 0,2M etikkahappo/suolahapolla pH 2,0. Inhibiittori eluointui fraktioissa 92 - 108.

Kuvio 7: PSTI-4A-minifuusiotuotteen preparatiivinen HPLC-ajo käyttäen kymotrypsiiniaffiniteetikolonnineluotteja (fraktiot 92 - 108) ja RP-318-kolonnia (250 x 4,6 mm) (Biorad). Eluointi suoritettiin käyttäen lineaarista gradienttia systeemissä 0,15 % trifluorietikkahappoa ja 60 % asetonitriiliä, joka sisälsi 0,15 % trifluorietikkahappoa (2 tuntia); virtausnopeus 1 ml/min, paine 150 baaria; fraktioiden määrittäminen 220 nm:n aallonpituudella. Ordinaattana on ilmoitettu ekstinktio 220 nm:n aallonpituudella, abskissana fraktion järjestysnumero. Inhibiittori eluointui fraktioissa 44 - 50.

Kuvio 8: PSTI-4A-minifuusiotuotteen analyttinen HPLC-ajo käyttäen esikolonnilla varustettua Ultra-pak TSK SP-5 PW -kolonnia (75 x 7,5 mm LKB).

Olosuhteet

Liutin A: 0,15 trifluorietikkahappoa ja  
0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
10 % metanolia, pH 2,7  
Liutin B: 0,15 % trifluorietikkahappoa ja  
0,6M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
10 % metanolia, pH 2,7



Gradientti: 0 - 5 min      5 % B:tä  
                   5 - 30 min    15 - 100 % B:tä  
                   30 - 33 min    100 - 15 % B:tä  
                   33 - 40 min    15 % B:tä

5            Virtausnopeus: 1,5 ml/min, paine 20 baaria  
                   Detektio: 215 nm

                  Kuvio 9: PSTI-5P:n loppupuhdistus preparatiivisella  
 HPLC:llä käyttäen RP-318-kolonnia (250 x 4,6 mm, Biorad).  
 Eluointi käyttäen lineaarista gradienttia systeemissä 0,15  
 10    % trifluorietikkahappoa ja 0,15 % trifluorietikkahappoa,  
 60 % asetonitriiliä kahdessa tunnissa. Virtausnopeus: 1  
 ml/min, paine 150 baaria; detektio 280 nm. Inhibiittori  
 eluoiutui fraktioissa 20 - 27.

                  Kuvio 10: PSTI-5P:n analyttinen HPLC-ajo käyttäen  
 15    Bio-Sil<sup>®</sup> TSK CM-3-SW -kolonnia (75 x 7,5 mm) (Biorad).

Olosuhteet

Liutotin A: 0,15 % trifluorietikkahappoa ja  
                   0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
                   10 % metanolia

20            Liutotin B: 0,15 % trifluorietikkahappoa ja  
                   0,6M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
                   10 % metanolia

Gradientti: 0 - 5 min      15 % B:tä  
                   5 - 30 min      15 - 100 % B:tä  
 ..            30 - 32 min    100 - 15 % B:tä  
                   32 - 40 min    15 % B:tä

Virtausnopeus: 1,5 ml/min, paine 22 baaria  
 Detektio: 215 nm

## Patenttivaatimukset

1. Menetelmä peptidin valmistamiseksi, joka oleellisesti käsittää ihmisen haiman erittämän trypsiini-inhibiittorin (PSTI:n) sekvenssin variantin ryhmästä

	PSTI	1	Thr-17	Leu-18	Ile-19	Tyr-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	2	Thr-17	Leu-18	Ile-19	Tyr-20	Asp-21	Asn-29
	PSTI	4	Thr-17	Leu-18	Glu-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29
10	PSTI	5	Thr-17	Val-18	Glu-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29
	PSTI	6	Thr-17	Leu-18	Glu-19	Tyr-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	7	Thr-17	Leu-18	Ile-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29
	PSTI	8	Thr-17	Val-18	Glu-19	Leu-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	9	Thr-17	Val-18	Glu-19	Leu-20	Arg-21	Asp-29
15	PSTI	11	Pro-17	Leu-18	Glu-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29
	PSTI	12	Pro-17	Val-18	Glu-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29
	PSTI	13	Thr-17	Ile-18	Glu-19	Tyr-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	17	Thr-17	Val-18	Ile-19	Tyr-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	18	Thr-17	Ile-18	Ile-19	Tyr-20	Asn-21	Asp-29
20	PSTI	19	Thr-17	Val-18	Ile-19	Tyr-20	Asp-21	Asn-29
	PSTI	20	Thr-17	Ile-18	Ile-19	Tyr-20	Asp-21	Asn-29
	PSTI	21	Thr-17	Ile-18	Glu-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29

jolloin variantti käsittää edelleen asemassa 32 ryhmän Pro, Ser tai Ala, t u n n e t t u siitä, että

a) isäntämikro-organismi transformoidaan ilmaisuvektorilla, joka sisältää DNA-sekvenssin, joka koodaa mainittua peptidiä;

b) peptidi otetaan talteen viljelmästä; ja

30 c) peptidi puhdistetaan.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,

t u n n e t t u siitä, että valmistetaan peptidi, joka lisäksi käsittää ryhmää Asp asemassa 1 edeltävän aminohapon tai peptidisekvenssin, edellyttäen, että sen biologisen aktiivisuus säilyy.

3. DNA, t u n n e t t u siitä, että se koodaa jossakin patenttivaatimuksista 1 - 2 mainittua peptidiä.

4. Ilmaisuvektori, t u n n e t t u siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 3 mukaisen DNA-sekvenssin.

5 5. Bakteeri-isäntäorganismi, t u n n e t t u siitä, että se on transformoitu patenttivaatimuksen 4 mukaisella ilmaisuvektorilla.

## Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en peptid som väsentligen innehåller en variant av sekvensen för human pankreatisk sekretorisk trypsininhibitor (PSTI) ur gruppen

	PSTI	1	Thr-17	Leu-18	Ile-19	Tyr-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	2	Thr-17	Leu-18	Ile-19	Tyr-20	Asp-21	Asn-29
	PSTI	4	Thr-17	Leu-18	Glu-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29
10	PSTI	5	Thr-17	Val-18	Glu-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29
	PSTI	6	Thr-17	Leu-18	Glu-19	Tyr-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	7	Thr-17	Leu-18	Ile-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29
	PSTI	8	Thr-17	Val-18	Glu-19	Leu-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	9	Thr-17	Val-18	Glu-19	Leu-20	Arg-21	Asp-29
15	PSTI	11	Pro-17	Leu-18	Glu-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29
	PSTI	12	Pro-17	Val-18	Glu-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29
	PSTI	13	Thr-17	Ile-18	Glu-19	Tyr-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	17	Thr-17	Val-18	Ile-19	Tyr-20	Asn-21	Asp-29
	PSTI	18	Thr-17	Ile-18	Ile-19	Tyr-20	Asn-21	Asp-29
20	PSTI	19	Thr-17	Val-18	Ile-19	Tyr-20	Asp-21	Asn-29
	PSTI	20	Thr-17	Ile-18	Ile-19	Tyr-20	Asp-21	Asn-29
	PSTI	21	Thr-17	Ile-18	Glu-19	Tyr-20	Arg-21	Asp-29

varvid varianten vidare innehåller gruppen Pro, Ser eller Ala i position 32, k ä n n e t e c k n a t därav, att

a) en värdmikroorganism transformeras med en expressionsvektor, som innehåller en DNA-sekvens som kodar nämnda peptid;

b) peptiden tillvaratas ur odlingen; och

30 c) peptiden renas.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer en peptid som ytterligare innehåller en aminosyra eller en peptidsekvens framför gruppen Asp i position 1, förutsatt att dess biologiska aktivitet bibehålls.

35

3. DNA, k ä n n e t e c k n a t därav, att det kodar en peptid som omnämnts i något av patentkraven 1 - 2.

5 4. Expressionsvektor, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller en DNA-sekvens enligt patentkrav 3.

5. Bakterievärdorganism, k ä n n e t e c k n a d därav, att den transformerats med en expressionsvektor enligt patentkrav 4.

*Asp Ser Leu Gly Arg Glu Ala Lys Cys Tyr Asn Glu Leu Asn Gly*  
 1 GACTCTCTGGGTCGTGAAGCTAAATGCTACAACGAACTGAACGGT  
 45 CTGAGAGACCCAGCACTTCGATTACGATGTTGCTTGACITGCCA  
 1 2 3 4 5 6

*Cys Thr Lys Ile Tyr Asn Pro Val Cys Gly Thr Asp Gly Asp Thr*  
 46 TGCACTAAGATCTACAACCCGGTTTGGGGTACCGACGGTGACACT  
 90 ACGTGATTCTAGATGTTGGGCCAAACGCCATGGCTGCCACTGTGA  
 7 8 9 10 11 12 13

*Tyr Pro Asn Glu Cys Val Leu Cys Phe Glu Asn Arg Lys Arg Gln*  
 91 TACCCGAACGAATGCGTTCTGTGCTTCGAAAACCGTAAACGTCAG  
 135 ATGGGCTTGCTTACGCAAGACACGAAGCTTTTGGCATTITGCAGTC  
 14 15 16 17 18

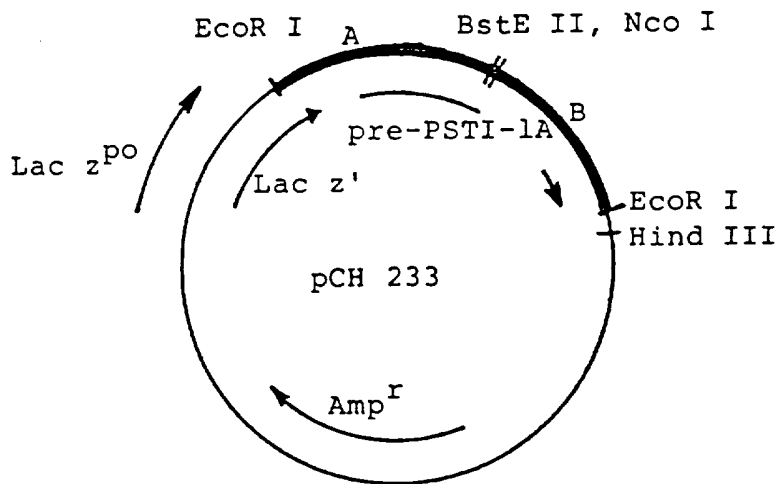
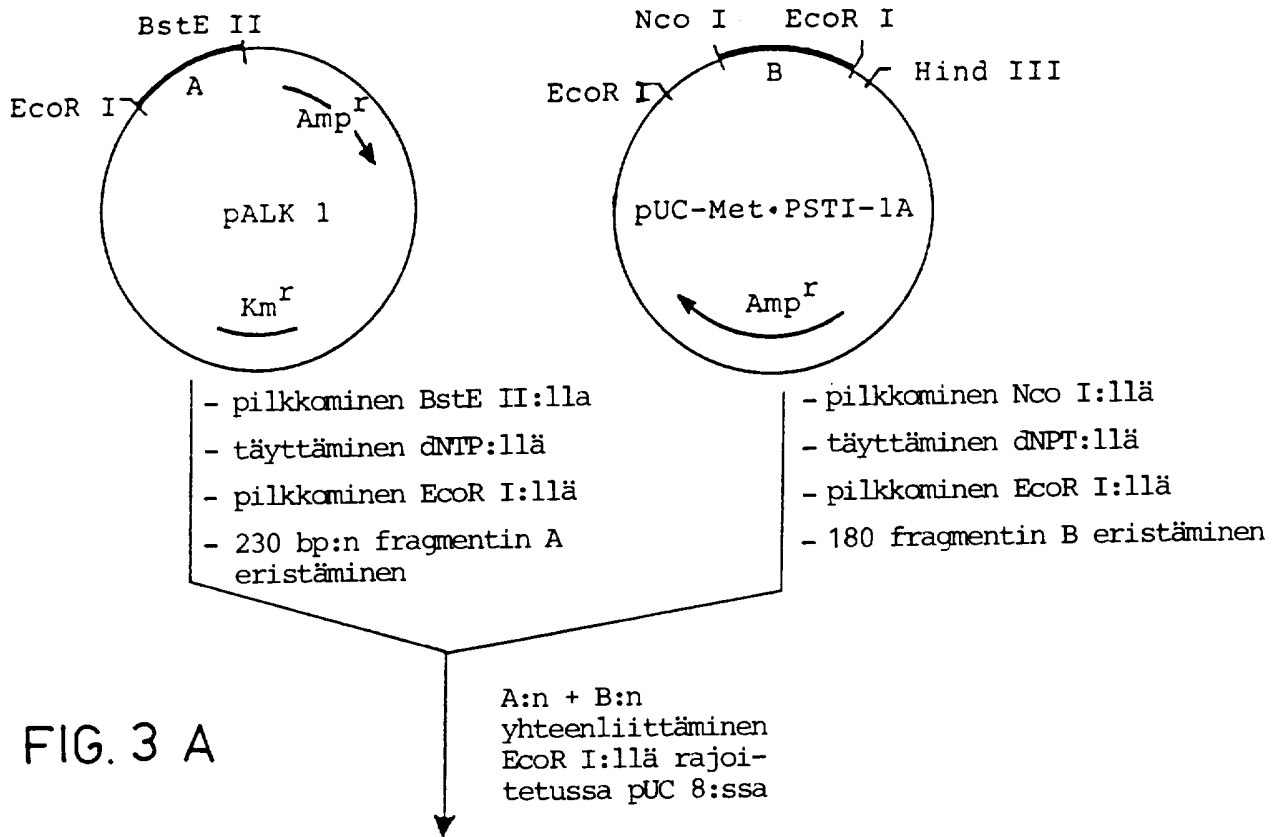
*Thr Ser Ile Leu Ile Gln Lys Ser Gly Pro Cys \*\*\**  
 136 ACTTCTATCCTGATCCAAGAAATCTGGTCCGTGCTGAATTC AAGCT  
 180 TGAAGATAGGACTAGGTCTTTAGACCAGGCACGACTTAAGTTTCCA  
 19 20 21 22 23 24

181 TC  
 186 AGGTAC  
 25

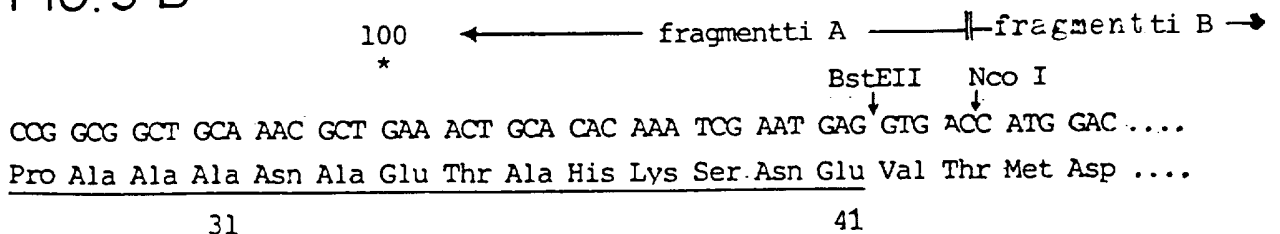
FIG. 1



pCH 233:n konstruktio



**FIG. 3 B**







pCH 236:n ja pCH 2361:n (pCH 2362:n) konstruktio

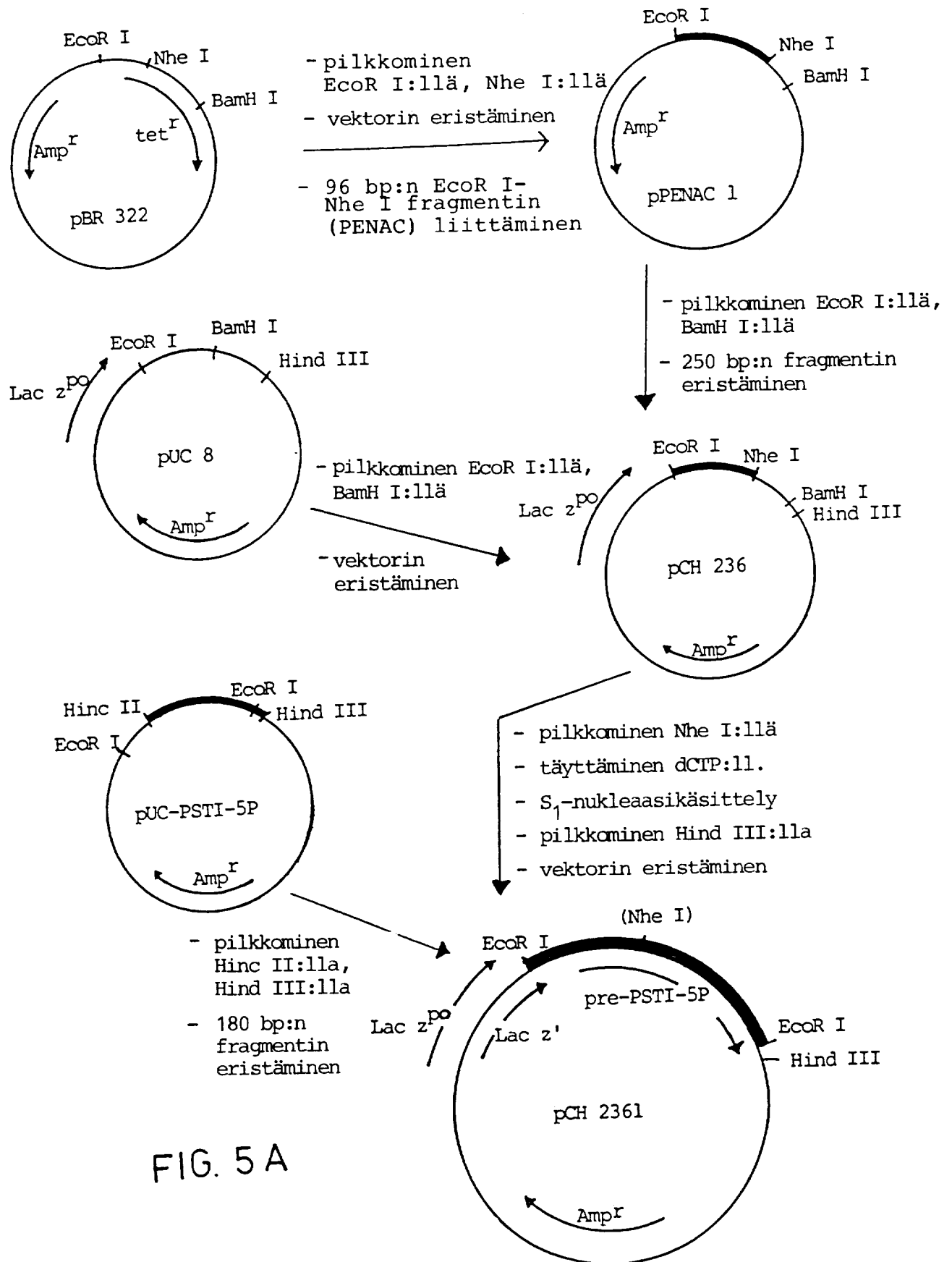


FIG. 5 A

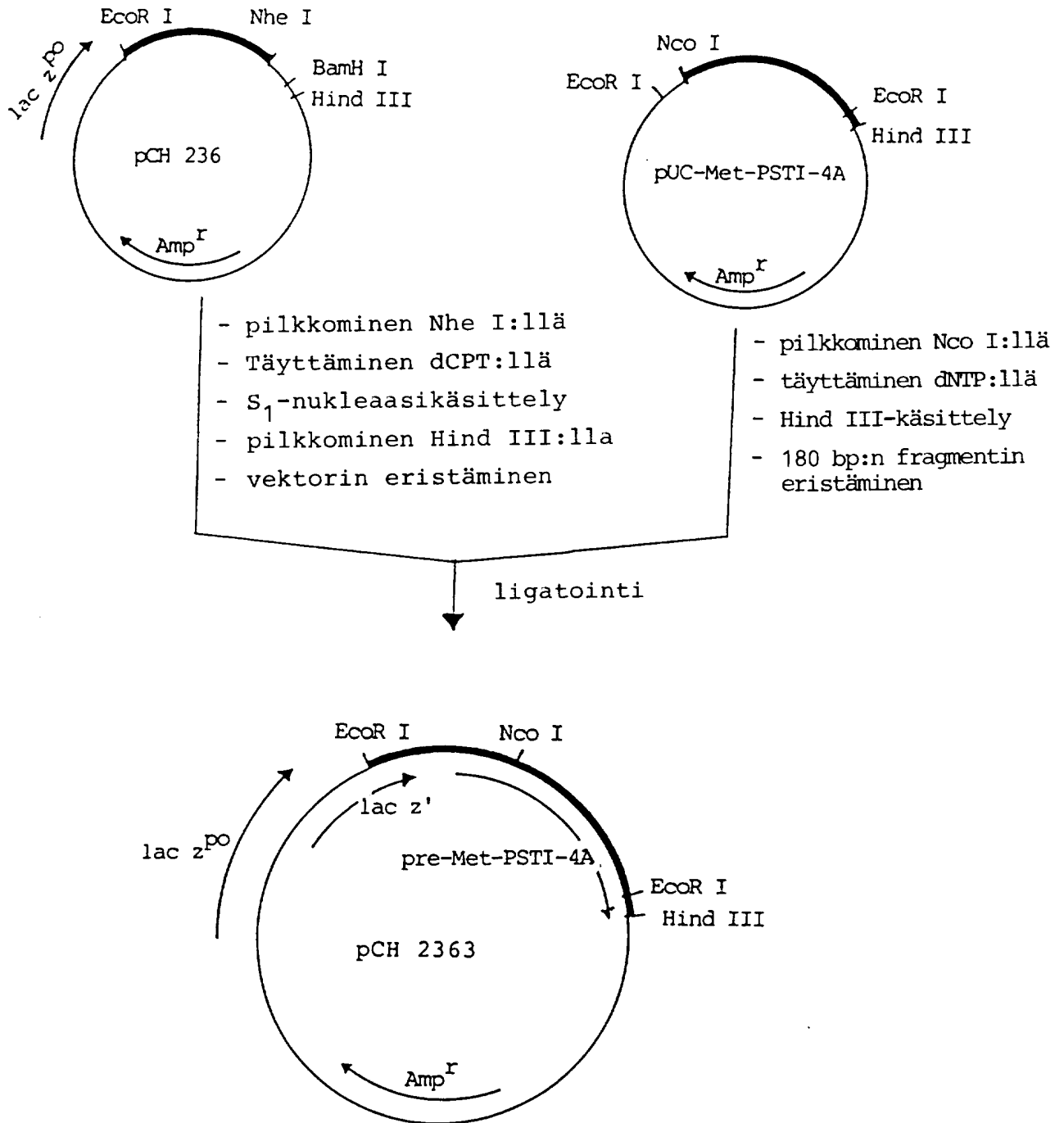
pCH 2363:n konstruktio

FIG. 5 B

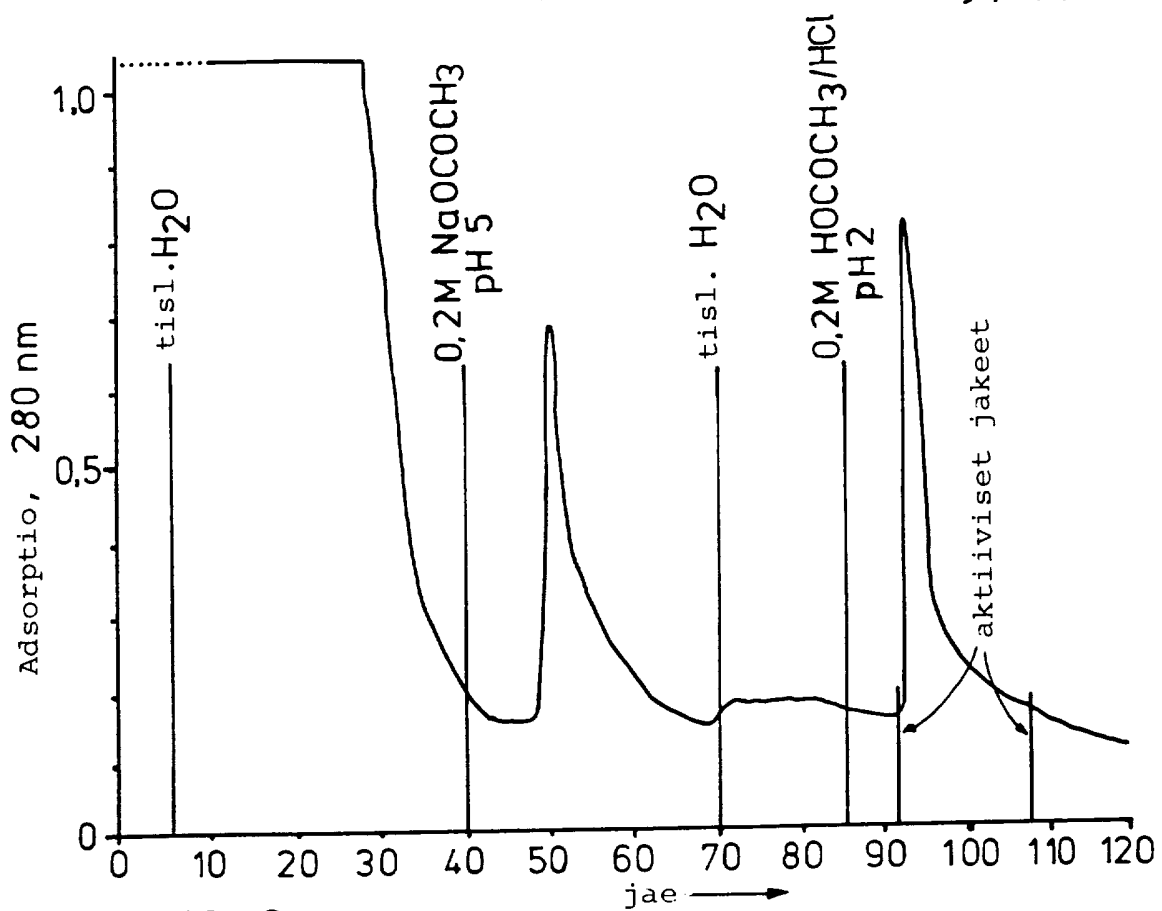


FIG. 6

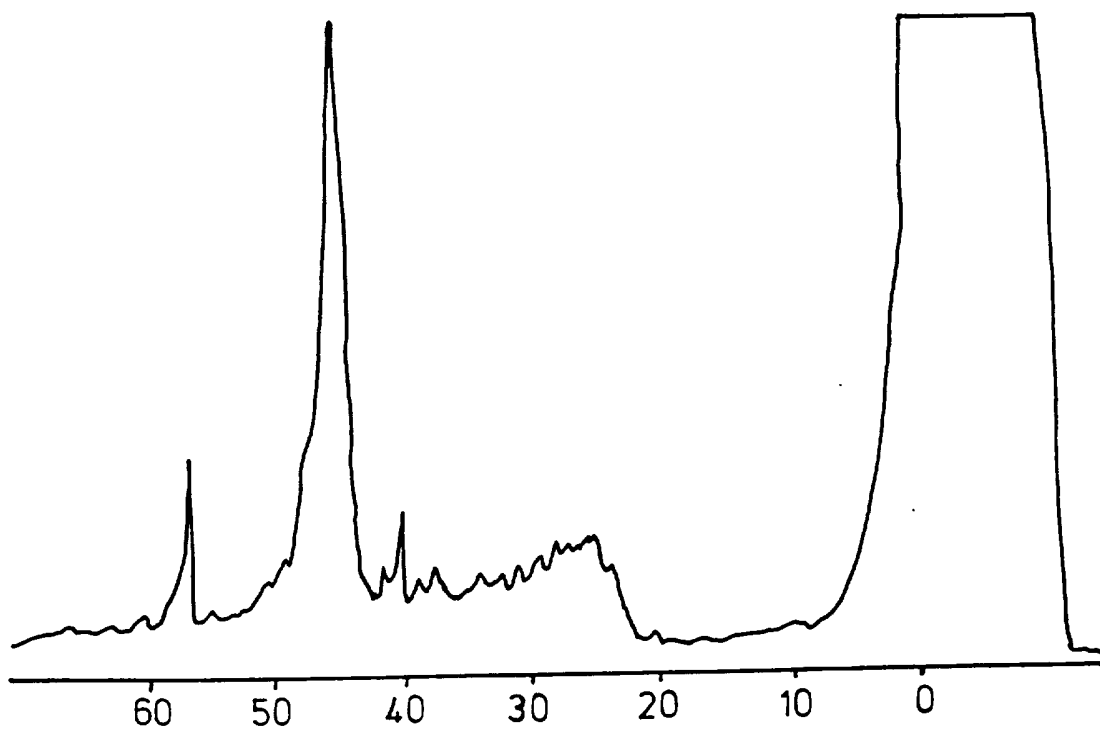


FIG. 7

FIG. 8

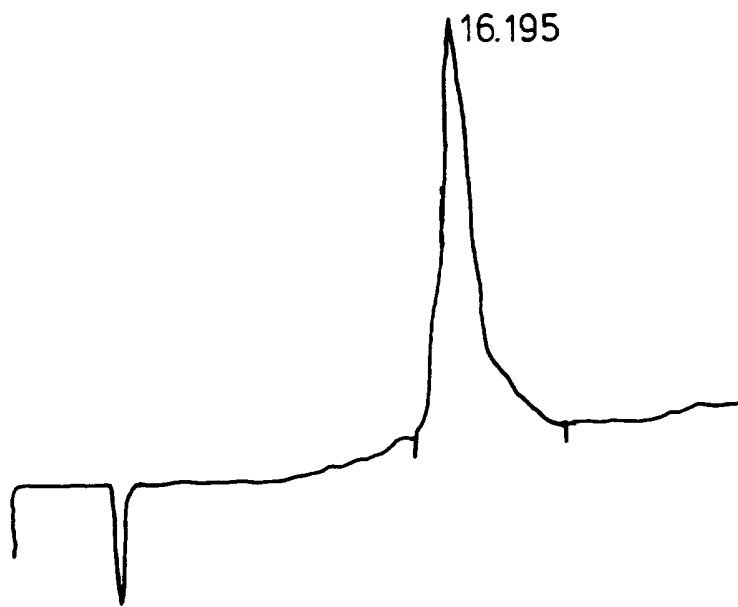


FIG. 9

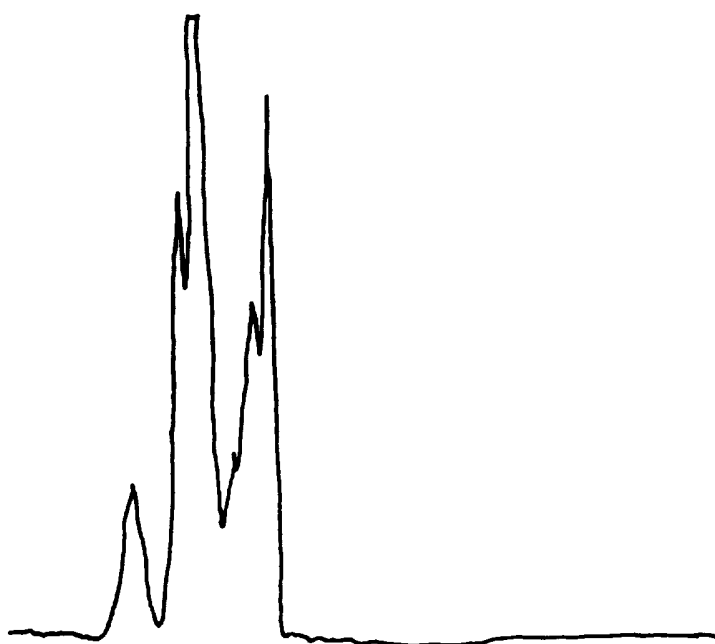


FIG. 10

