

ELJÁRÁS HATÉKONY REKOMBINÁNS SZERIN-PROTEÁZ INHIBITOROK

ELŐÁLLÍTÁSÁRA ÉS EZEK ALKALMAZÁSA

75358

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás rekombináns szerin-proteáz inhibitor előállítására. Az előállított rekombináns szerin-proteáz inhibitor alkalmas szerin-proteáz aktivitás módosítására, és így olyan kompozíciókban alkalmazható, amelyek sejtek, illetve szövetek gyulladásos folyamatok következtében fellépő károsodásának megelőzésére és kezelésére alkalmazhatók.

Jellemezés alá írt
Deuter

P9602886

2131 67

KÖZZÉTÉTEL
FELDANY

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEKY IRODA KFT.

"A"

ELJÁRÁS HATÉKONY REKOMBINÁNS SZERIN-PROTEÁZ INHIBITOROK
ELŐÁLLÍTÁSÁRA ÉS EZEK ALKALMAZÁSA

The Trustees of the University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, US

Feltalálók:

RUBIN Harvey, Philadelphia, PA, US

COOPERMAN Barry S., Penn Valley, PA, US

SCHECHTER Norman, Philadelphia, PA, US

PLOTNICK Michael, Havertown, PA, US

WANG Zhi Mei, Philadelphia, PA, US

A bejelentés napja: 1995.04.11.

Elsőbbségei: 1994.04.18. (08/229 286) US

1994.07.19. (08/276 936) US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US95/04488

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/28422

84644-7976-GI

A találmány tárgya eljárás hatékony rekombináns szerin-proteáz inhibitorok előállítására és ezek alkalmazása.

A szerin-proteáz inhibitorok vagy "szerpin"-ek az olyan inhibitorok alcsoportját képezik, amelyek egy gazdaszervezet túléléséhez alapvetően szükséges különböző biológiai folyamatok közvetítésében vesznek részt. A szerpin csoport tagjai számos biológiai folyamatban, így például gyulladásos folyamatokban, megtermékenyítésben, daganatos sejtek vándorlásában, neurotropizmusban és a hő-sokkos folyamatokban játszanak szerepet. Nemrégén azonosították és jellemezték a maspint, mint egy védő szerpint, amely normálisan jelen van az emlősök epitéliumában, de hiányzik a legtöbb emlős karcinoma sejtvonalból. A szerpinek megtalálhatók a növényekben, prokariótákban, rovarokban és állatokban. A szerpinek természetes mutánsai és módosulatai számos súlyos betegséggel kapcsolatosak. A szerpin hibás működése a tüdő, máj és vér koagulációs betegségeivel, például tüdőtágulással, máj-cirrózissal, trombózissal és tüdőembóliával kapcsolatos.

A szerpinek és az endogén, valamint a mikrobiális proteázok kölcsönhatása számos olyan molekulát eredményez, amelyek egy evolúciósan nagymértékben konzervatív olyan hemostatikus mechanizmusban vesznek részt, amely biztosítja, hogy egy gazdaszervezet túléléséhez alapvetően szükséges, intakt, aktív szerpinek koncentrációja fennmaradjon. Így például a szerpin-proteáz komplex és a szerpin hidrolizált inaktív formája stimulálja az interleukin-6 termelését, jelet ad a

hepatocitáknak, hogy fokozzák az akut fázisú proteinek, így a szerpin-csoport egy alpopulációjának a termelését. Míg a szerpin-enzim komplexek gyorsan kiürülnek a keringésből, ezen komplexek hasított és intakt formái gyulladásos helyeken felszaporodhatnak. Ez a felszaporodás a kemoattraktív anyagok és a kemotaxis inhibitorok, valamint a neutrofil degranuláció aktivátorainak és inhibitorainak, a leukotriéneknek, a vérlemezke aktiváló faktornak (PAF) és a szuperoxid-termelésnek a komplex mikrokozonyezetét hozza létre. Egyes himlővírusok extrém virulenciáját részben egy olyan szerpinnek tulajdonítják, amelynek a célpontja a cisztein-proteináz ICE, az interleukin 1- β átalakító enzim.

Különböző állatmodelleken bemutatták, hogy a nem-kontrollált szerin-proteáz aktivitás nagymértékben hozzájárul a tüdő károsodásához, és hogy egy megfelelő szerpin-válasz szabályozza a károsodás mértékét. Így például az antitrombin III (ATIII) az α -1-proteáz inhibitorral (α 1P1) kombinálva védelmet nyújt a birka számára az endotoxinnal indukált tüdőkárosodás ellen, míg az egyes szerpinek nem olyan hatékonyak, mint a kombináció [Redens et al., *Circ. Shock*, **26**, 15 (1988)]. Redens és munkatársai azt is kimutatták, hogy az ATIII védelmet nyújt az elterjedt intravaszkuláris koaguláció kifejlődésével szemben endotoxémiás patkányok esetén [Emerson et al., *Circ. Shock*, **21**, 1 (1987)]. A H_2O_2 egy befogója és az elasztáz egy klór-metil-ke-ton inhibitora blokkolja a neutrofil elasztáz által közvetített akut ödémás tüdőkáro-

sodás reaktív oxigén által történő megindítását patkányban, és az $\alpha 1\text{PI}$ csökkenti a bleomycin által közvetített tüdőgyulladást, valamint az utána fellépő fibrózist [Baird et al., *Physiol.*, **61**, 2224 (1986); Nagai et al., *Am. Rev. Resp. Dis.*, **145**, 651 (1992)]. Más rendszerben azonban a neutrofil elasztáz inhibitorok, az Eglin C és egy kis molekulatömegű vegyület, az L 658 758 nem gátolták a leukotrién B₄ által indukált neutrofil által közvetített megtapadást, diapedezist és a véredények szivárgását [Rosengren et al., *Am. J. Physiol.*, **259**, H1288 (1990)]. Amint ezek a tanulmányok mutatják, a terápiásan adagolt proteolitikus enzim inhibitorok gátolhatják a gyulladásos folyamatok molekuláris és celluláris mechanizmusát és csökkenthetik a szövetkárosodást.

A szerpin csoportnak két alcsoportja van. Az egyik csoportba olyan proteinek tartoznak, amelyekhez még nem azonosítottak közös eredetű szerin-proteázokat. Ebbe a csoportba tartoznak például az ovalbumin, angiotenzinogén és a szteroid kötő globulinok. A másik csoportba olyan proteinek tartoznak, amelyekhez legalább egy szerin-proteáz található mint inhibitor célpont. A szerpinek azon csoportja, amelyeknek tagjai gátolják a szerin-proteázokat, olyan jellegzetességekkel rendelkezik, amelyek meghatározzák az inhibitor aktivitását, azaz közös eredetű enzimjeik másodrendű sebességi konstansai 10^2 és $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ közé esnek; az enzim-inhibitor komplex bizonyos körülmények között stabil és SDS-poliakril-amid gélen a különálló komponensekénél nagyobb molekulatömeggel rendelkező

anyagként detektálható; és a reaktív centrumban található rögzült kötés hasításának hatására nagymértékben konform változás következik be, ami a protein fokozott hőstabilitásához vezet. Egy e csoportba tartozó szerpin például az α -1-antikimotripszin (ACT), a kimotripszin (Chtr) inhibitora. Az ACT-t elsősorban a máj szintetizálja, és ez az akut fázis egyik olyan reagense, amelynek a szintje számos sérülés, így sebészi beavatkozás, akut szívizom-infarktus, égési sérülések, autoimmun betegségek, rosszindulatú daganatok, fertőzések és átültetett szerv kilökődési májreakció hatására gyorsan emelkedik több mint ötszörösére. Az ACT összefügg az idegrendszer plaszticitásával is, és az Alzheimer-betegségben fellépő β -amiloid lerakódásokkal az idős agyban, a Down-tünetegyüttessel és az amiloidózissal járó örökletes agyi hemorrágia holland változatával kapcsolatos. Kimutatták, hogy mind a natív ACT, mind a rekombináns ACT (rACT) szuszpenzióban gátolja a humán neutrofilek szuperoxid képzését.

A gátló szerpinen található reaktív hurok általában egy viszonylag rövid aminosav-szekvenciából áll. A szerpinek szelektivitása a proteázok egyes típusainak gátlására nézve a szerpin felületén elhelyezkedő reaktív centrum aminosav-szekvenciájától függ. Jiang H. és munkatársai [*J. Biol. Chem.*, **269**, 55-58 (1994)] igazolták, hogy egy lepidoptera rovarból, a *Manduca sexta*-ból származó szerpinek szelektivitása módosítható, ha a reaktív hurok aminosav-szekvenciáját megváltoztatják. Úgy találták, hogy a pre-mRNS kötése az inhibi-

tor diverzitását és proteínázok széles választékának szabályozási lehetőségét alakítja ki, ugyanazon protein-keret alkalmazásával, amely a különböző reaktív-hely kazettákhoz csatlakozik.

A kisméretű inhibitorok (kb. 50 aminosav) és cél-enzimeik által alkotott komplexek háromdimenziós szerkezete alapján feltételezhető, hogy a P3-P3' terület, az ACT-ben a 356-361. aminosav [Schechter I. és Berger A.C. nomenklatúrája, *Biochemistry Biophysics Research Communication*, **26**, 157 (1967)] a szerpin hurkában, vagy az úgynevezett "aktív hely terület" (vagy csalétek terület) a proteázzal való elsődleges érintkezési területként vagy kötőhelyként szolgál. Mostanában úgy találták, hogy a hurok másik része (a P14-től a P9-ig), amelyet "horgonyzóhelynek" neveznek, szintén fontos a serpinek inhibitor aktivitása szempontjából.

Kísérleteink során kidolgoztunk egy eljárást szerin-proteáz aktivitás módosítására a sejtekben vagy szövetekben, ami abban áll, hogy kiválasztjuk azt a cél-proteázt, amely felhalmozódik a sejtekben vagy szövetekben, rekombináns szerin-proteáz inhibitort állítunk elő, amelynek olyan módon megváltoztatott aminosav-szekvenciájú reaktív centrum hurok proteáz kötőhelye és horgonyzóhelye van, hogy az inhibitor és a cél-proteáz közötti kölcsönhatás megváltozik, és a sejteket vagy szöveteket a megváltoztatott szerin-proteáz inhibitorral hozzuk érintkezésbe úgy, hogy a szerin-proteáz aktivitás megváltozzék. Olyan kompozíciókat is létrehoztunk, amelyek képe-

sek hatékonyan módosítani a szerin-proteáz aktivitást, és amelyek olyan rekombináns szerin-proteáz inhibitor tartalmaznak, amelynek megváltoztatott aminosav-szekvenciájú reaktív centrum hurok proteáz kötőhelye és horgonyzóhelye van. Ezek a kompozíciók gyulladásos folyamatok szabályozására alkalmazhatók. Emellett kifejlesztettünk egy módszert olyan szerin-proteáz inhibitorok előállítására, amelyek képesek hatékonyan módosítani a szerin-proteázok aktivitását, ami abban áll, hogy meghatározzuk egy szerin-proteáz inhibitor szekvenciáját; azonosítjuk az illető szerin-proteáz inhibitor reaktív hurkát, amely reaktív hurok egy első, proteáz kötőhely aminosav-szekvenciát és egy második, horgonyzóhely aminosav-szekvenciát tartalmaz; úgy módosítjuk az első, proteáz kötőhely aminosav-szekvenciát, hogy a rekombináns szerin-proteáz inhibitor szelektivitása más proteázokra nézve megváltozzék; úgy módosítjuk a második, horgonyzóhely aminosav-szekvenciát, hogy a rekombináns szerin-proteáz inhibitor képes legyen hatékonyan módosítani a szerin-proteáz aktivitását; és szintetizáljuk ezt a módosított szerin-proteáz inhibitor.

A találmány tárgya tehát eljárás olyan rekombináns szerin-proteáz inhibitor előállítására, amely képes hatékonyan módosítani a szerin-proteázok aktivitását, ami abban áll, hogy meghatározzuk egy kiválasztott szerin-proteáz inhibitor szekvenciáját; azonosítjuk az illető szerin-proteáz inhibitor reaktív hurkát, amely reaktív hurok egy első, proteáz kötőhely aminosav-szekvenciát és egy második, horgonyzóhely ami-

nosav-szekvenciát tartalmaz; úgy módosítjuk az első, proteáz kötőhely aminosav-szekvenciát, hogy a rekombináns szerin-proteáz inhibitor szelektivitása más proteázokra nézve megváltozzék; úgy módosítjuk a második, horgonyzóhely aminosav-szekvenciát, hogy a rekombináns szerin-proteáz inhibitor képes legyen hatékonyan módosítani a proteáz aktivitását; és szintetizáljuk ezt a módosított szerin-proteáz inhibitort.

A találmány tárgya továbbá olyan kompozíció, amely képes hatékonyan módosítani a szerin-proteáz aktivitást, és amely olyan rekombináns szerin-proteáz inhibitort tartalmaz, amelynek megváltoztatott aminosav-szekvenciájú reaktív hurok proteáz kötőhelye és horgonyzóhelye van.

A találmány tárgya ezenkívül eljárás szerin-proteáz aktivitás módosítására a sejtekben vagy szövetekben, ami abban áll, hogy kiválasztjuk azt a cél-proteázt, amely felhalmozódik a sejtekben vagy szövetekben; rekombináns szerin-proteáz inhibitort állítunk elő, amelynek olyan módon megváltoztatott aminosav-szekvenciájú reaktív centrum hurok proteáz kötőhelye és horgonyzóhelye van, hogy az inhibitor és a cél-proteáz közötti kölcsönhatás megváltozik; és a sejteket vagy szöveteket a megváltoztatott szerin-proteáz inhibitorral hozzuk érintkezésbe úgy, hogy a szerin-proteáz aktivitás megváltozzék.

A találmány ezenkívül humán α -1-antikimotripszin-analógokra vonatkozik, amelyek a kimotripszin hatékony inhibitorai.

Meghatároztunk és rendelkezésre bocsátunk nukleinsav-

-szekvenciákat, amelyek szerin-proteáz inhibitorokat, többek között az α -1-antikimotripszin-analógokat kódolják, expressziós vektorokat, amelyek ezeket a nukleinsav-szekvenciákat tartalmazzák, transzformált gazdasejteket, amelyek ezen nukleinsav-szekvenciákat fejezik ki, sejttenyészeteket, amelyek szerin-proteáz inhibitorokat fejeznek ki és protein-készítményeket, amelyek ezen szerin-proteáz inhibitorokat tartalmazzák.

A szerpin glikoprotein-csoportba tartozó szerin-proteáz inhibitorok fontosak a test homeosztázisának fenntartása szempontjából. A szerpinek olyan proteázokat szabályoznak, amelyek számos fontos biológiai folyamatban vesznek részt, így például a vérkoagulációban, megtermékenyítésben és a gyulladásos folyamatokban. Különbé, állatokban és rovarokban előforduló szerpinekről feltételezhető, hogy génmegduplázódás és divergencia következtében fejlődtek ki, ami nagyszámú szerpin-gént eredményezett egyetlen szervezeten belül, amelyek mindegyike egyedi reaktív-hely területtel és fiziológiai funkcióval rendelkező proteint kódol. Egy ilyen szerpin például az antikimotripszin (ACT), amely a kimo tripszint, a hasnyálmirigy elasztázt, a hízósejt kimázt és a katepszin G-t gátolja. Az ACT megemelkedett szintje figyelhető meg számos sérülés, így sebészi beavatkozás, akut szív-izom-infarktusok, égési sérülések, autoimmun betegségek, rosszindulatú daganatok, fertőzések és beültetett szervek ki-lökődési májreakciói esetén.

Az ACT kapcsolatos bizonyos, sejtek által közvetített és citokinek által közvetített eseményekkel. Így például a tumor nekrozis faktor fokozza a katepszin G neutrofilekből történő, TNF által közvetített felszabadulásának vérlemezkék által való aktiválását. Ezt a hatást az ACT blokkolhatja. Emellett a leukotrién B₄ és a vérlemezke aktiváló faktor TNF-fel stimulált neutrofilek által történő szintézise és felszabadulása blokkolható ACT-vel. A neutrofil eredetű katepszin G és a hízósejt eredetű kimáz a legfontosabb komponensek a bőr és tüdő gyulladásos válaszfolyamataiban. Így feltételezhető, hogy az ACT szabályozó szerepet játszik a gyulladásos folyamatok korlátozásában, amelyek másodlagosan jönnek létre a granulómák enzimtartalmának felszabadulása után. Mind a natív, mind a rekombináns ACT-ről kimutatták, hogy gátolja a humán neutrofilek szuperoxid-képzését. Az intakt sejtszrendszerben mind az intakt ACT, mind a kimo-tripszinnel komplexet képzett ACT egyformán hatékonynak bizonyult abban, hogy gátolták az f-Met-Leu-Phe, Con A, illetve PMA által stimulált humán neutrofilek szabadgyök termelését. Olyan családokban, akik a normális, keringésben levő ACT-nek csak az 50 %-ával rendelkeznek, nagy visszamaradó térfogattal járó tüdőrendellenességek és az atopiás betegségek nagyobb gyakorisága fordul elő. Úgy tűnik tehát, hogy az intakt ACT, valamint az ACT hasított és komplexbe vitt formái központi szerepet játszanak a gyulladásos folyamatok szabályozásában és bizonyos fejlődési eseményekben.

Az ACT bizonyos tulajdonságaiban megegyezik a szerpin csoport más tagjaival. Az ACT és más, inhibitor aktivitással és specificitással rendelkező szerpinek legfontosabb tulajdonsága egy mobilis reaktív hurok jelenléte.

A szerin-proteáz inhibitorok vagy "szerpinek" feltételezhetőleg a következő általános mechanizmus szerint gátolják cél szerin-proteázukat. A szerin-proteáznak szubsztrátként szerpinre van szüksége és proteolitikus támadást indít be. A szerpinek szigorúan 1:1 arányú komplexet képeznek cél-proteázukkal, egy specifikus helyen, a P1 maradékon történő kölcsönhatáson keresztül. A standard jelölés a P1 helyzetet közvetlenül a hasítási helyhez képest N-terminálisként jelöli, a P2 N-terminális a P1-hez képest és így tovább. A P1 helyzet a szerpinnek egy kitett területén, a reaktív huroknak nevezett területen helyezkedik el. Nagyszámú, a peptid inhibitorokra jellemző szerkezeti adat áll rendelkezésre, amelyek azt igazolják, hogy az inhibitor reaktív hurka antiparallel β -lánc-konformációval rendelkezik, amelyet "kanonikus"-nak jelölnek. Úgy találtuk azonban, hogy az intakt szerpin reaktív hurka egy kissé torzított hélikus konformációt vesz fel úgy, hogy a P1 oldallánc a szerpin többi részétől kifelé terjed. A reaktív hurok nem rendeződik kanonikus, antiparallel β -lánc konformációba, hanem inkább úgy tűnik, hogy a hélix később destabilizálódik a proteázzal való kötődéshez. A proteázzal való kötődés a szerpin konformációváltozását indukálja, ami bizonyos körülmények között magának a proteáznak a megváltozását

eredményezi. A proteáz megváltozott konformációja megszünteti az enzim aktivitását, és így a proteáz enzimreakció-útja megszakad.

A szerpinkutatás egy fontos területe a szerpinek és cél-enzimjeik közötti egyensúly hiánya, valamint a szövetkárosodások és degeneratív betegségek közötti összefüggés feltárása. A szerpinek és genetikailag manipulált változataik cél-proteázaikkal való kölcsönhatásának biokémiai és szerkezeti sajátosságai részletes tanulmányozása alapján új, terápiás aktivitással rendelkező proteinek tudatos tervezése és kifejlesztése történt. Kis (kb. 50 aminosav méretű) peptid-inhibitorok és cél-enzimjeik közötti komplexek háromdimenziós modellje alapján feltételezhető, hogy a szerpinek hurkának P3-P3' területe, amelyet "aktívhely terület"-ként vagy "csalétek terület"-ként is említene, az enzimmel való elsődleges érintkezési helyként vagy kötőhelyként szolgál. A szerpín egy meghatározott enzim iránti inhibitor aktivitása megváltoztatható a proteáz kötőhely területében levő aminosavaknak mutáció vagy kiiktatás útján történő módosításával. Így például úgy találtuk, hogy ha a vad típusú ACT P1' helyzetében egy leucint metioninnal helyettesítünk, olyan mutánst kapunk, amely részben gátolja a humán neutrofil elasztázt, katepszin-G-t és kimázt (lásd az 1. és 2. táblázatot). Úgy találtuk továbbá, hogy egy olyan változat, amelyben a reaktív hurok P6'-P9' maradékait kiiktattuk, megtartotta szerin-proteáz inhibitor aktivitását kimotripszinnel szemben és fo-

kozódott az aktivitása humán neutrofil elasztázzal szemben. A humán neutrofil elasztáz, kimotripszin, katepszin G és kimáz aktivitását az alábbiakban, a 2-5. példában bemutatott módon mértük. A plazmin és a trombin aktivitását szintén mértük, ismert módon, például a Cooperman et al., *J. Biol. Chem.*, **268**, 23615 (1993) irodalmi helyen ismertetett módon.

Ezenkívül úgy találtuk, hogy a horgonyzóhely terület (P14-P9) a huroknak fontos területe a szerpinek inhibitor-aktivitásának megtartása szempontjából. Az aminosav-szekvencia kiírása azt mutatja, hogy minden inhibitor szerpin horgonyzó területe nagymértékben konzervatív olyan aminosavakra nézve, amelyek kicsi és semleges oldalláncot, például alanint vagy glutaminsavat tartalmaznak. A rekombináns ACT-ben (rACT) a P14 helyzetben levő treonin argininnel való helyettesítése olyan szubsztrátot eredményez, amely elveszti inhibitor aktivitását (lásd az 1. és 2. táblázatot).

A találmány értelmében kidolgoztunk egy eljárást olyan rekombináns szerin-proteáz inhibitor előállítására, amelynek hatékonyan módosítható az aktivitása. Az eljárás értelmében egy kiválasztott szerin-proteáz inhibitornak megállapítjuk a szekvenciáját, és azonosítjuk a reaktív hurkát. Ezután e hurok proteáz-kötőhelyének aminosav-szekvenciáját módosítjuk úgy, hogy a szerin-proteáz inhibitor más proteázok iránti szelektivitása módosuljon. A proteáz-kötőhely módosítása történhet a szekvenciában levő egy vagy több aminosav helyettesítésével vagy kiiktatásával. Egy előnyös megvalósítási mód

szerint a módosítás abban áll, hogy a proteáz-kötőhely területben levő néhány aminosavat olyan aminosavakkal helyettesítünk, amelyekről ismeretes, hogy más szerin-proteáz inhibitorokban fordulnak elő. Így például az ACT P1' helyzetében levő leucin metioninnal (azon aminosavval, amely a szerpinnak, egy a humán neutrofil elasztáz inhibitorának α 1P1 helyzetében van jelen) történő kicserélése olyan mutánst eredményez, amely gátolja a kimotripsint, katepszin-G-t, kimázt és a humán neutrofil elasztázt (lásd az 1. és 2. táblázatot). A proteáz-kötőhely aminosav-szekvenciájában végrehajtandó megfelelő helyettesítés meghatározása szakember számára rutin feladat a találmány szerinti kitanítás alapján. A horgonyzóhely aminosav-szekvenciája szintén módosítható. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a horgonyzóhelyet úgy módosítjuk, hogy első sorban olyan aminosavakat tartalmazzon, amelyek kis, semleges oldalláncot tartalmaznak, így például alanint vagy treonint. Ezt a módosított rekombináns szerin-proteáz inhibitorot azután szintetizáljuk. A módosításokat végezhetjük standard helyspecifikus mutagenézissel, ami szakemberek számára ismert technika.

A találmány szerinti megoldás egy előnyös megvalósítási módja szerint a módszert ACT analógjainak előállítására használjuk. Az ACT egyedülállónak tűnik a szerpinek között azon képessége szempontjából, hogy kötődik a DNS-hez. Az ACT-t bizonyos rosszindulatú és nem-rosszindulatú sejtek sejtmagjában lokalizálták, és megállapították, hogy gátolja a DNS-poli-

meráz-alfát, a permeabilizált humán karcinoma sejtekben a DNS szintézist és a poli-C-től függő primázt, valamint stimulálja a poli-dT-től függő primázt. Úgy találtuk, hogy az rACT két rövid területében levő lizinmaradékok fontosak a DNS-kötés szempontjából. Az rACT két komponenst tartalmaz, egy lizin-csoportot (210-212. maradékok) és a C-terminális 390-398. peptidet, amely két, a DNS-kötési kölcsönhatásban résztvevő lizint tartalmaz. A 210-212. lizinek glutamáttal vagy treoninnal történő kicserélése a DNS-kötési aktivitás teljes elvesztését eredményezi. A DNS-kötési aktivitás részben megmarad, ha csak egy vagy két lizint cserélünk ki treoninnal. A C-terminális peptid esetén úgy találtuk, hogy az rACT-ben a K396, a legaktívabb lizin acetilezése csökken DNS jelenlétében, és két lizin, a K391 és K396 treoninnal való helyettesítése olyan proteint eredményez, amely nagyon csekély DNS-kötő képességgel rendelkezik. Így a rekombináns ACT-analógok termelésekor és kiválasztásakor további módosítások hajthatók végre a 210-212. lizinek és a C-terminális 390-398. peptid esetén, hogy az inhibitor DNS-kötését megváltoztassuk.

A szerpinek és szerin-proteázok közötti kölcsönhatás tanulmányozása azt mutatta, hogy a szerpinnak a proteázhoz való kötésével járó konformációváltozás fontos az illető szerin-proteáz aktivitásának gátlása szempontjából.

A találmány értelmében olyan kompozíciókat is létrehoztunk, amelyek hatékonyan képesek megváltoztatni a szerin-proteáz aktivitást. Egy találmány szerinti kompozíció egy

olyan rekombináns szerin-proteáz inhibitor tartalmaz, amely megváltoztatott aminosav-szekvenciával rendelkező proteáz-kötőhelyet és horgonyzóhelyet tartalmaz a reaktív hurokban. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a horgonyzóhely módosított aminosav-szekvenciája kis és neutrális oldallánccal rendelkező aminosavakat, például alanint és treonint tartalmaz. A találmány szerinti kompozíciók különösen hasznosak a sejtekben és a szövetekben felgyülemelő szerin-proteázzal kapcsolatos gyulladásos folyamatok szabályozására.

A találmány értelmében egy a szerin-proteáz aktivitás sejtekben és szövetekben történő módosítására szolgáló módszer is kidolgoztunk. A módszer értelmében kiválasztunk egy a sejtekben vagy szövetekben felhalmozódó cél-proteázt, előállítunk egy olyan rekombináns szerin-proteáz inhibitor, amelynek oly módon megváltoztatott aminosav-szekvenciával rendelkező proteáz-kötőhelye és horgonyzóhelye van a reaktív centrum hurokban, hogy az inhibitor és a cél-proteáz közötti kölcsönhatás megváltozzék, és a módosított szerin-proteáz inhibitorral érintkezésbe hozzuk a sejteket vagy szöveteket, hogy a szerin-proteáz aktivitása megváltozzék. Előnyös, ha a szerin-proteáz inhibitor horgonyzóhelyének aminosav-szekvenciáját olyan aminosavakkal módosítjuk, amelyek kis és neutrális oldalláncot tartalmaznak, így például alaninnal vagy treoninnal.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint a módosított szerin-proteáz aktivitás a kimáz aktivitás. Ebben az esetben

előnyös, ha a szerin-proteáz inhibitor a humán vad típusú α -1-antikimotripszin olyan analógja, amely a 358. vagy a 356-361. helyen tartalmaz aminosav-módosítást.

Egy másik megvalósítási mód szerint a módosított szerin-proteáz aktivitás az elasztáz aktivitás. Ebben az esetben előnyös, ha a szerin-proteáz inhibitor a humán vad típusú α -1-antikimotripszin olyan analógja, amely a 358. vagy a 356-361. helyen tartalmaz aminosav-módosítást.

Közelebbről a találmány értelmében olyan rekombináns úton előállított szerin-proteáz inhibitorokat készítünk, amelyek az α -1-antikimotripszin analógjai. Ezek az analógok hatékonyan gátolják a kimotripsint. Így például előállítjuk az α -1-antikimotripszin egy olyan analógját, amelyben a vad típusú α -1-antikimotripszin 350-helyzetben levő alaninját argininnel cseréljük ki. Szintén előállítottuk a vad típusú humán α -1-antikimotripszin olyan analógját, amelyben a 349-368. helyzetben levő Ala-Ala-Thr-Ala-Val-Lys-Ile-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu-Thr-Arg-Thr-Ile-Val (31. szekvencia) aminosav-szekvenciát Gly-Thr-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Thr (32. szekvencia) aminosav-szekvenciára cseréltük ki. Ezt az analógot rACT-P10P10' jellel jelöltük. Emellett előállítottuk a vad típusú humán α -1-antikimotripszin olyan analógját is, amelyben a 349-363. helyzetben levő Ala-Ala-Thr-Ala-Val-Lys-Ile-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu (33. szekvencia) aminosav-szekvenciát Gly-

Thr-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-Pro-Glu (34. szekvencia) aminosav-szekvenciára, míg a 368. helyzetben levő Val-t Ala-ra cseréltük ki. Ezt az analógot rACT-P10P5' jellel jelöltük. A találmány szerinti analógok előállíthatók az azonosított aminosavhelyettesítésekkel rendelkező szekvenciának megfelelő nukleotidszekvenciákról. Az olyan proteinek, amelyek több vagy kevesebb aminosavat tartalmazó aminosav-szekvenciával, fragmenssel rendelkeznek vagy egy vagy több aminosavban különböznek az itt ismertetett α -1-antikimotripszin-analógoktól, és antikimotripszin, antitripszin, antitrombin, anti-humán neutrofil elasztáz (HNE) aktivitással rendelkeznek, szintén a találmány tárgykörébe tartoznak.

Meghatároztunk továbbá nukleinsav-szekvenciákat, amelyek rekombináns szerin-proteáz inhibitorokat, többek között α -1-antikimotripszin analógokat kódolnak, kialakítottunk expressziós vektorokat, amelyek ezeket a nukleinsav-szekvenciákat tartalmazzák, olyan transzformáns gazdasejteket, amelyek ezen nukleinsav-szekvenciákat képesek kifejezni, és olyan sejttenyészeteket, amelyek képesek kifejezni a rekombináns szerin-proteáz inhibitorokat, így a találmány szerinti humán α -1-antikimotripszin analógokat, továbbá proteinkészítményeket, amelyek a rekombináns szerin-proteáz inhibitorokat, így a humán α -1-antikimotripszin analógokat tartalmazzák.

A rekombináns szerin-proteáz inhibitorokat, így az α -1-antikimotripszin analógokat általában olyan gazdasejtekben

állítjuk elő, amelyek az illető rekombináns szerin-proteáz inhibitort kódoló nukleinsav-szekvenciát tartalmazó expressziós vektorral vannak transzformálva. A gazdasejteket olyan körülmények között tenyésztjük, hogy az illető szerin-proteáz inhibitort kódoló nukleinsav-szekvencia kifejeződjék. Megfelelő, a termék feldúsulásához szükséges idő után az inhibitort a gazdasejtből vagy az azt körülvevő közegből tisztítjuk.

A találmány szerinti megoldásban alkalmazható, rekombináns szerin-proteáz inhibitort, például α -1-antikimotripszin termelésére képes expressziós rendszert képező gazdasejtek és expressziós vektorok kiválasztása szakember számára rutin feladat. A találmány szerinti megoldásban alkalmazható gazdasejtek az olyan prokariota és eukariota sejtek, amelyek úgy transzformálhatók, hogy stabilan tartalmazzák és kifejezzék az illető rekombináns szerin-proteáz inhibitorokat. Ilyen sejtek például a baktérium, élesztő és emlős sejtek. Ha prokariota gazdasejteket alkalmazunk, akkor a szerin-proteáz inhibitor glikozilezése nem következik be. Meglepő módon azonban úgy találtuk, hogy a nem-glikozilezett szerin-proteáz inhibitor, a humán α -1-antikimotripszin funkcionálisan lényegében véve hasonló a natív humán szérum α -1-antikimotripszinhez, és így a nem-glikozilezett rekombináns szerin-proteáz inhibitorok terápiás alkalmazás esetén vélhetőleg hatékonyan helyettesítik a natív szerin-proteáz inhibitorokat. Protein termékek előállításához előnyösen *E. coli*

baktériumot alkalmazunk, mivel a klónozás és expresszálas egyszerűen és gyorsan elvégezhető. Emellett *E. coli* termelése alkalmas gazdaságos és nagyméretű fermentációhoz és protein tisztításához. Egy rekombináns szerin-proteáz inhibitort kódoló nukleinsav-szekvenciát tartalmazó expressziós vektor gazddasejtbe történő bevitele számos módszerrel elvégezhető, így kalcium-kloridos vagy lítium-kloridos kezeléssel vagy elektroporációval.

A rekombináns szerin-proteáz inhibitort, például egy humán α -1-antikimotripszin-analógot kódoló expressziós vektor előnyösen további, transzlációt és transzkripciót szabályozó elemeket is tartalmaz, működőképesen kapcsolva a rekombináns szerin-proteáz inhibitort kódoló nukleinsav-szekvenciához; így például felfelé egy promotert, amelyet egy, riboszóma köthelyet tartalmazó transzlációs iniciációs szignál és egy iniciációs kodon követ, míg lefelé egy transzkripciós terminációs kodont. A transzkripciós és transzlációs szabályozó elemek bármilyen funkciós kombinációban vagy sorrendben ligálhatók. A találmány szerinti megoldás bármelyik megvalósítási módjában alkalmazott transzkripciós és transzlációs szabályozó elemeket azon sejtnak megfelelően kell megválasztani, amelybe az expressziós vektort bevinni kívánjuk, úgy hogy expressziós rendszer jöjjön létre.

Előnyös, ha erős promotert alkalmazunk, így például *E. coli* trp-lac promotert vagy a T7 P_L promotert, hogy a protein termék magasszintű expresszióját biztosítsuk. Úgy találtuk,

hogy a pINomp és β -laktamáz promoterek az α -1-antikimotripszin alacsony vagy semmilyen hozamát sem eredményezik, ha az α -1-antikimotripszint kódoló DNS-sel működőképesen kapcsoljuk. Előnyös továbbá, ha a promoter indukálható, mint például a P_L promoter, hogy elkerüljük a termék felhalmozódása során az esetleges gazdasejt toxicitást.

Eljárhatunk úgy is, hogy T7 bakteriofág RNS-polimerázon alapuló génexpressziós rendszert alkalmazunk, amint azt Studier és Moffatt, a *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130 (1986) irodalmi helyen ismertetik. Ebben a rendszerben egy kiválasztott rekombináns szerin-proteáz inhibitort kódoló nukleinsav-szekvenciához működőképesen kapcsolt T7 bakteriofág promotert tartalmazó plazmiddal transzformált *E. coli* sejteket olyan λ -fággal fertőzünk, amely a T7 RNS-polimeráz kifejezhető génjét tartalmazza. A sejteket azután fertőzzük a fággal, miután a plazmid elegendő kópiája van jelen a gazdasejtekben, és a protein szintézise a fertőzés után hamarosan bekövetkezik.

A rekombináns szerin-proteáz inhibitort kódoló nukleinsav-szekvenciát tartalmazó transzformáns gazdasejtek azután egy a gazdasejt számára alkalmas tenyészközegen tenyésztethetők. Ha indukálható promotert alkalmaztunk, a gazdasejteket nagy sejtsűrűségig tenyésztjük, majd a promotert bekapcsoljuk a fúziós protein és a proteáz expresszáására. Ha nem-indukálható promoter van jelen, a protein termék kötelező termelése következik be. Az ilyen inhibitorok kötelező termelése

csak olyan expressziós rendszerekben előnyös, ha lényegében véve nem toxikus a gazdasejtre nézve. A sejteket addig tenyésztjük, amíg a termék képződése nem emelkedik tovább, vagy ha a termék képződéséhez fogyasztott tápanyag aránya egy előre meghatározott szint alá csökken, amikor is a sejteket összegyűjtjük, lizáljuk, és a kapott protein terméket szokásos módszerrel tisztítjuk. A megfelelő expressziós vektorral transzformált gazdasejtek és az ilyen gazdasejtek tenyésztete a találmány szerinti rekombináns szerin-proteáz inhibitor szintetizálására alkalmazhatók. A rekombináns szerin-proteáz inhibitor protein-termékek előállíthatók a gazdasejtekből és a sejttenyészetekből.

A gazdasejteket olyan tenyészközegen tenyésztjük, amelyek alkalmasak arra, hogy a sejteket fenntartsuk, és a sejtek és a tenyészközeg olyan elegyét hozzuk létre, amely a rekombináns szerin-proteáz inhibitort tartalmazza. Eljárhatunk úgy is, hogy az elegyet tisztítjuk. E célra alkalmazható tisztítási módszerek például – de nem kizárólag – az ioncsere-kromatográfia, affinitás-kromatográfia, elektroforézis, dialízis és más, a technika állása szerint ismert protein-tisztítási módszerek. A gazdasejtekből származó, tisztított vagy nem-tisztított rekombináns szerin-proteáz inhibitort tartalmazó protein-készítményeket állítunk elő. Ezek a készítmények tartalmazzák a rekombináns szerin-proteáz inhibitorokat és esetleg más anyagokat a sejtek és a tenyészközeg keverékéből, a protein tisztasági fokától függően.

A találmány tárgya tehát eljárás rekombináns szerin-proteáz inhibitorok, így például humán α -1-antikimotripszin analógok előállítására, amelynek során a rekombináns szerin-proteáz inhibitorokat expresszálni képes gazdasejtet tenyésztjük, és adott esetben az elegyet tisztítjuk és kinyerjük a tisztított rekombináns szerin-proteáz inhibitorokat.

A találmány szerinti "tiszt", illetve "tisztított" nukleinsav-szekvencián olyan nukleinsav-szekvenciát értünk, amely lényegében véve mentes olyan nukleinsavaktól, amelyek nem a rekombináns szerin-proteáz inhibitort kódolják, illetve más olyan anyagoktól, amelyek a nem-rekombináns sejtekkel kapcsolatosak.

A találmány szerinti "tiszt", illetve "tisztított" rekombináns szerin-proteáz inhibitor protein kifejezésen celluláris anyagoktól – legalábbis bizonyos fokig – mentes rekombináns szerin-proteáz inhibitort értünk. A rekombináns szerin-proteáz inhibitor tisztasága vagy homogenitása előnyösen legalább 25-100 %. Még előnyösebben a tisztaság mintegy 50 % vagy ennél nagyobb.

A találmány szerinti eljárással előállított rekombináns szerin-proteáz inhibitorok olyan betegségek kezelésére alkalmazhatók, amelyek a proteázok vagy azok inhibitorainak abnormális működésével kapcsolatosak. Így például szerin-proteázok, mint az elasztáz, katepszin G, kimázok és triptázok kapcsolatosak a fagocitózissal. Ezen proteázok vagy inhibitoraik abnormális működése a gyulladásos folyamatokkal, kötő-

szöveti gázgyülemmel, felnőttkori légzési distressz tünettel (ARDS) és reumás ízületi gyulladásal kapcsolatos. Szerin-proteázok, így a tripszin, kimotripszin, elasztáz és enterokináz résztvesznek az emésztésben. Ezen proteázok vagy inhibitoraik abnormális működése kapcsolatos a hasnyálmirigy-gyulladással. Szerin-proteázok, így a plazmin és a plazminogén aktivátor kapcsolatos a fibrinolízissel. Ezen proteázok vagy inhibitoraik abnormális működése kapcsolatos a daganatok elterjedésével. Szerin-proteázok, így a IX-faktor, Xa-faktor, XIa-faktor, XIIa-faktor, VIIa-faktor, trombin, aktivált C-protein és a plazma-kallikrein résztvesznek a vérkoagulációban. Ezen proteázok bármelyikének vagy inhibitoraiknak abnormális működése kapcsolatos az érrendszeri alvadásokkal, agyinfarktussal és koszorúér infarktussal. Szerin-proteázok, így a C1r-faktor, C1s-faktor, D-faktor, B-faktor és a C3-konvertáz résztvesznek a komplement-aktiválásban. Ezen proteázok vagy inhibitoraik abnormális működése kapcsolatos a reumás ízületi gyulladásal és a gyulladásos folyamatokkal. Szerin-proteázok, így a szöveti kallikrein és a prolin után hasító enzimek résztvesznek a hormonképzésben és -lebontásban. Ezen proteázok és inhibitoraik abnormális működése kapcsolatos a gyulladásos folyamatokkal. Szerin-proteázok, így a plazmin, plazminogén aktivátor és az akrozin résztvesznek a peteérésben és a megtermékenyítésben. Ezen proteázok vagy inhibitoraik abnormális működése kapcsolatos a termékenységszabályozásával. ATP-függő proteázok vesznek részt a protein-

körfolyamatban. Az ezen proteázokkal és inhibitoraikkal kapcsolatos abnormalitások szerepet játszanak az izomsorvadásban és a lázban.

A találmány szerinti rekombináns szerin-proteáz inhibitorokat hatékony mennyiségben, farmakológiailag elfogadható vivőanyaggal együtt adagoljuk. A "hatékony mennyiség" kifejezésen a rekombináns szerin-proteáz inhibitor olyan koncentrációját értjük, amely alkalmas a kiválasztott proteáz aktivitásának módosítására. E mennyiség meghatározása szakember számára rutin feladat a kezelendő személy testtömege, kora és klinikai állapota alapján. Az alkalmas farmakológiailag elfogadható vivőanyagok a technika állása szerint jól ismertek, ilyeneket ír le például az e területen standard kiadványként ismert Gennaro, Alfonso (szerk.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18. kiadás, 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA. Az alkalmas farmakológiailag elfogadható vivőanyagokat az adagolás módja és a szokásos gyógyszerészeti gyakorlat alapján választjuk ki. Az ilyen kompozíciók bármilyen alkalmas úton adagolhatók, így – azonban nem kizárólag – intravénásan, orálisan, intraperitoneálisan, intramuszkulárisan, szubkután, topikálisan, valamint a bőrön vagy kötőszöveten, például orr-, száj-, hüvely-, végbél- és a tápcsatorna-kötőszöveten keresztül történő abszorpciós úton. Az aktív komponens és a vivőanyag egymáshoz viszonyított aránya a rekombináns szerin-proteáz inhibitor kémiai természetétől, oldhatóságától és stabilitásától függ. A találmány szerinti megoldás értelmében

előállított kompozíciók adagolhatók önmagukban vagy más vegyületekkel kombinálva, ideértve – de nem kizárólag – más rekombináns szerin-proteáz inhibitorokat, antitesteket, toxinokat és antiszensz oligonukleotidokat. Ezen vegyületek hasznosíthatók olyan betegek diagnosztizálásában és kezelésében is, akik vad típusú szerin-proteáz inhibitor hiányban szenvednek. Családi előfordulásban a normális plazmaszint 64 %-ánál kevesebb α -1-antikimotripsinnel (ACT) rendelkező betegeket (ACT-hiányos betegek), valamint a normálisnak 50 %-ával rendelkező rokonaikat vizsgáltuk. Nyolc, 25 évnél idősebb ACT-hiányos beteg közül hat májrendellenességekben szenvedett, míg a nyolcból hárman tüdőrendellenességekben szenvedtek. Ezek a rendellenességek a súlyos megbetegedés és az enyhe laboratóriumi eltérés között változtak, és úgy tűnik, hogy az ACT-nek a génjében előforduló egy vagy két allél törlődéséből adódó normálistól eltérő expresszációval függ össze, ami a Chtr proteáz szabályozatlan aktivitását okozza [Eriksson et al., *Acta. Med. Scand.*, **220**, 447 (1986)]. A humán α -1-antikimotripsin (ACT) két hiányos mutánsa kapcsolatos a krónikus obstruktív tüdőbetegséggel (COPD) [Poller W. et al., *Genomics*, **17**, 740 (1993)]. Egy család három egymás utáni generációjában olyan hiányos allélt figyeltek meg, amelyet az 55-helyzetben levő leucin prolinnal történt helyettesítése okozott. Egy másik, a 229-helyzetben levő prolin alaninnal való helyettesítéséből adódó mutáció ACT szérumbeli hiányával volt kapcsolatos négy, pozitív családi történettel rendelkező

beteg esetén. Ezen mutációk mindegyike esetén a mutációval kapcsolatos fiziológiai megnyilvánulás enyhíthető korai diagnózissal és a hiány kezelésével. A mutánsok azonosítása jól ismert PCR vagy RT-PCR módszerekkel, valamint a találmány szerinti rekombináns szerin-proteáz inhibitorokkal való korreláció megkönnyíti az ilyen állapotok diagnosztizálását. Emellett a találmány szerinti kompozíciók felhasználhatók az ilyen hiányosságok kezelésére.

A találmány szerinti megoldást a következő példákkal szemléltetjük, a korlátozás szándéka nélkül.

1. példa

ACT analógok készítése és tisztítása

Az ACT expressziós vektorból, pACT-ből kiindulva ismert helyspecifikus mutagenézissel, az Ala-Ala szekvencia Gly-Thr szekvenciára való cseréjével egyedi *KpnI* restrikciós helyet alakítottunk ki a P10-P9 helyen, és a Val Thr-re való cseréjével egyedi *MluI*-helyet a P10'-P11' helyen. Az ezen expressziós vektor által kódolt rACT variáns asszociációs sebességi konstansa $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$, és az SI-értéke a vadtypushoz viszonyítva 1 ekvivalens. Ezután kazetta-variánsokat hoztunk létre úgy, hogy eltávolítottuk a *KpnI*-*MluI* fragmenst, és megválasztott kodonszekvenciával rendelkező szintetikus kettősszálú oligonukleotidot iktattunk be a helyére. A kazetta vektorokban rACT-P10P10', rACT-P210P5" és rACT-OM mutánsokat hoztunk létre.

PCR módszerrel, ismert technikák alkalmazásával rACT-T345R, rACT-A347R és rACT-A350R pontmutánsokat hoztunk létre. Emellett két PCR reakcióhoz egy specifikus mutációt kódoló belső primer komplementer-párt alkalmaztunk megfelelő külső primerjeikkel való párképzéssel. A két PCR reakció két olyan szekvenciát eredményezett, amelyek tartalmazták a mutációs helyeket és komplementer végekkel rendelkeztek. A két szekvenciát ekvimoláris koncentrációban tartalmazó keveréket alkalmaztuk mutánst templátként két külső primerrel egy PCR reakcióban a mutáns gén amplifikálására. Az így kapott rACT-T345R, rACT-A347R és rACT-A350R pontmutánsokat nukleinsav-szekvenálással igazoltuk.

A vad típusú rACT-t és mutánsait a baktériumok franciasajtóban történő lizálásával, majd centrifugálással és a felülúszó anioncserélő oszlopra történő felvitelével és sógradienssel való eluálásával tisztítottuk. Az aktív frakciót egy DNS-cellulóz oszlopra vittük fel és sóoldattal eluáltuk. A tisztított termék egyetlen csíkot mutatott az SDS-PAGE gélen. Az így kapott mutánsokat az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat

Az antikimotripszin reaktív központi hurkának mutánsai

Szekv. sz.	Név	Szekvencia/Mutáció				
		P10	P5	P1P1'	P5'	P10'
3	rACT (vad típusú)	TEASAATAVKITLLSALVETRTIVRFN				
4	rACT-L358M	:::M:::				
5	rACT-L358R	:::R:::				
6	rACT-L358W	:::W:::				
7	rACT-V-P3'	:::V:::				
8	rACT-P3P3'	:::IPMSIP:::				
9	rACT-P6-P3	:::LEAIPMSIP:::				
10	rACT-CAS	:::GT:::T:::				
11	rACT-CAS-F	:::GT:::F:::T:::				
12	rACT-CAS-M	:::GT:::M:::T:::				
13	rACT-CAS-P3-P3'	:::GT:::IPSMIP:::T:::				
14	rACT-CAS-P3-P3'/L	:::GT:::IPLSIP:::T:::				
15	rACT-CAS-ElasW	:::GT:::VISAEW:::T:::				
16	rACT-CAS-Try	:::GTMFLEAIPMSIPPE:::T:::				
17	rACT-P10P5'	:::GTMFLEAIPMSIPPE:::A:::				
18	rACT-P10P10'	:::GTMFLEAIPMSIPPEVKFNT:::				
19	rACT-T345R	R:::				
20	rACT-T347R	:R:::				
21	rACT-T350R	:::R:::				
22	rACT-PZM/P3P4' Δ P6'9'	:::GTTAVKIIIPMSIPPE///T:::				
23	rACT-PI-P3'R	:::IPRSIP:::				
24	rACT-Hep Cof II	:::MPLSTQ:::				
25	rACT-Anti-Trombin	:::AGRSLN:::				
26	rACT-Ci inhibitor	:::VARTLL:::				
27	rACT-PAI	:::SARMAP:::				
28	rACT-antiplazmin	:::MSRMSL:::				
29	rACT-protein C inhibitor	:::TFRSAR:::				
30	α 1P1 (vad típusú)	TEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFT				

A fenti táblázatban ":" jelentése: azonos a vad típusúval; és "/" jelentés: egy aminosav törlése.

2. példa

Humán neutrofil-elasztáz aktivitás gátlása

100 mmól/l-es, 500 mmól/l NaCl-t tartalmazó Hepes-ben, pH=7,5-nél, szobahőmérsékleten, 0,0053 abszorbancia-egység (410 nm)/perc/pmol/ml fajlagos aktivitást feltételezve, N-

-MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA-val (1. szekvencia; végső koncentráció 1,0 mmól/l 1 %-os Me₂SBSO-ban) mértük a humán neutrofil elasztáz koncentrációt. 500 mmól/l-es, 0,025 % Tx-100-t tartalmazó Tris-HCl-ben, pH=8,3-nál, szobahőmérsékleten, 0,02 abszorbancia-egység (410 nm)/perc/pmol/ml fajlagos aktivitást feltételezve, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA-val (2. szekvencia; végső koncentráció 0,2 mmól/l 0,2 %-os Me₂SO-ban) mértük a Chtr aktivitást. A gátlás sztöchiometriájának (SI) elemzését 1 ml, 100 mmól/l Tris-HCl-t és 0,005 térfogat% Triton X-100-t tartalmazó oldatban, pH=8,3-nál végeztük, konstans (mintegy 180 μmol/l) mennyiségű Chtr és változó koncentrációban vett rACT és mutánsok jelenlétében. Az rACT mutánsok által a Chtr ellen kifejtett gátlás arányát 25 °C-on, másodrendű körülmények között, ekvimoláris koncentrációban Chtr-t és inhibitor aktivitással rendelkező mutánsokat tartalmazó reakcióelegyben mértük. A kísérlettel kapott eredményeket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

3. példa

Katepszin G aktivitás gátlása

Humán neutrofil eredetű katepszin G-t szereztünk be az Athenes Research and Technology, Inc.-től (Atén, GR) és tisztítás nélkül alkalmaztuk. A katepszin G koncentrációját standard körülmények között mértük (0,1 mól/l Hepes, 7,5 és 1 mmól/l Suc-AAPF-p-NA, 37 °C), 250 pmól termék/perc fajlagos aktivitást feltételezve. A katepszin G (250 mmól/l) és rACT variánsok reakcióját 25 °C-on, 0,1-0,2 ml oldatban hajtottuk

végre, amely a következő pufferek valamelyikét tartalmazta: PBS, pH=7,4; 0,1 mól/l Tris-HCl, pH=8,3; 0 mól/l Tris-HCl, pH=7,0; 1,0 mól/l NaPi, pH=7,0; 1 mól/ NaPi, pH=8,3. Különböző mennyiségű inhibitorral 15-30 percig végzett inkubálás után mértük a maradék aktivitást spektrofotometriásan, alikvot minta 0,8 ml standard vizsgálati puferrel készült 4-8-szoros hígításával, amely 4 mmól/l Suc-AAPF-pNA szubszt-rátot tartalmazott. A szubsztrát hidrolízisének sebessége a maradék aktivitás meghatározásához vett 2 percen belül konstans volt, ami arra utal, hogy a katepszin G--ACT komplex a hígítással szemben stabil volt. A kísérletek eredményét a 2. táblázatban foglaltuk össze.

4. példa

Kimotripszin aktivitás gátlása

A kimotripszin (Chtr) aktivitást 500 mmól/l-es, 0,025 % Tx-100-t tartalmazó Tris-HCl-ben, pH=8,3-nál, szobahőmérsékleten, 0,02 abszorbancia-egység (410 nm)/perc/pmol/ml fajlagos aktivitást feltételezve, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA-val (2. szekvencia; végső koncentráció 0,2 mmól/l 0,2 %-os Me₂SO-ban) mértük. A gátlás sztöchiometriájának (SI) elemzését 1 ml, 100 mmól/l Tris-HCl-t és 0,005 térfogat% Triton X-100-t tartalmazó oldatban, pH=8,3-nál végeztük, konstans (mintegy 180 μmól/l) mennyiségű Chtr és változó koncentrációban vett rACT és mutánsok jelenlétében. Az rACT mutánsok által a Chtr ellen kifejtett gátlás arányát 25 °C-on, másodrendű körülmények között, ekvimoláris koncentrációban Chtr-t és inhi-

bitor aktivitással rendelkező mutánsokat tartalmazó reakcióelegyben mértük. A kísérlettel kapott eredményeket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

5. példa

Kimáz aktivitás gátlása

A kimázt a Schecter et al., *J. Biol. Chem.*, **268**, 23626 (1993) irodalmi helyen ismertetett módon tisztítottuk és határoztuk meg a koncentrációját. A kimáz különböző rACT inhibitorok által történt gátlását titrálással határoztuk meg. 200 nmól/l kimázt emelkedő mennyiségű rACT variánsokkal titráltunk, 1-2 mól/l NaCl-t, 0,1 mól/l Tris-HCl-t és 0,01 térf% Triton X-100-t tartalmazó reakcióelegyben, pH=8,0-nál, 25 °C-on, 50-100 µl oldattérfogatban. A megfelelő inkubációs idő utáni maradék aktivitást úgy mértük, hogy alikvot mintát vettünk a reakcióoldatokból, hígítottuk szubsztrátként 1 mmól/l Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA-t (2. szekvencia) tartalmazó 1 ml vizsgálópufferrel, és a pNA felszabadulást 410 nm-nél 3 percig spektrofotometriásan figyeltük. A szubsztrát hidrolízise konstans volt a 3 perc megfigyelési idő alatt, ami arra utal, hogy a kimáz--ACT komplexek a hígítással szemben stabilak voltak, és a módszerrel kapott maradék aktivitási értékek a szabad enzim megbízható mértékének tekinthetők. Az adatokat részleges aktivitás értékekre számoltuk át, és minden reakció esetén az $[I]_0/[E]_0$ érték függvényében ábrázoltuk a gátlás sztöchiometriájának meghatározásához. A kimáz különböző rACT inhibitorok által bekövetkezett gátlásának sebessé-

gi állandóját (k_{obs}/I) szubsztrát jelenlétében pszeudo-elsőrendű körülmények között mértük. Az inhibitor-koncentrációk legalább tízszer magasabbak voltak, mint az SI-vel szorzott enzim-koncentrációk. Az adatokból számított megfigyelt gátlási sebességi állandót a szubsztrát jelenlétére korrigáltuk, hogy megkapjuk a k_{obs}/I értékeket. Az eredményeket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat

Szekv. száma	Kimotripszin gátlása	Katepszin G gátlás	Kimáz gátlás	Humán neutrofil elasztáz gátlás	Trombin gátlás	Plazmin gátlás
3	a	a	p	i	p	
4	a	a	p	p		
5	p	p	i		a	a
6			v			
7	a		a			
8	a	a	a	a		
9	a			p		
10	a	a	p	i	p	
11	v	v	p			
12	a	a	p	p		
13	a	a	a	a		
14	a			i		
15	i			i		
16	i					
17	p			i		
18	p			i		
19	i	i		i		
22	a			a		
30				a		

Jelmagyarázat:

v: igen aktív, jobban, mint a természetes szérpin inhibitor

a: aktív

p: részlegesen aktív

i: inaktív

SZEKVENCIALISTA

(1) ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ:

- (i) BEJELENTŐ: The Trustees of the University of Pennsylvania,
Philadelphia, PA, US
- (ii) A TALÁLMÁNY CÍME: ELJÁRÁS HATÉKONY REKOMBINÁNS
SZERIN-PROTEÁZ INHIBITOROK ELŐÁLLÍTÁSÁRA ÉS EZEK
ALKALMAZÁSA
- (iii) A SZEKVENCIÁK SZÁMA: 34
- (iv) LEVELEZÉSI CÍM:
- (v) KOMPUTERREL OLVASHATÓ FORMA:
- (vi) AKTUÁLIS BEJELENTÉSI ADATOK:
- (viii) KÉPVISELŐ:
- (ix) TELEKOMMUNIKÁCIÓS ADATOK:

(2) INFORMÁCIÓK AZ 1. SZEKVENCIÁHOZ

- (i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:
 - (A) HOSSZ: 4
 - (B) TÍPUS: aminosav
 - (D) TOPOLOGIA: lineáris
- (xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 1. szekvencia

Ala Ala Pro Val

(2) INFORMÁCIÓK A 2. SZEKVENCIÁHOZ

- (i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:
 - (A) HOSSZ: 4
 - (B) TÍPUS: aminosav
 - (D) TOPOLOGIA: lineáris
- (xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 2. szekvencia

Ala Ala Pro Phe

(2) INFORMÁCIÓK A 3. SZEKVENCIÁHOZ

- (i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:
 - (A) HOSSZ: 27
 - (B) TÍPUS: aminosav
 - (D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 3. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Lue	Leu	Ser
1				5					10					15

Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn
				20					25		

(2) INFORMÁCIÓK A 4. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 27
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 4. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Met	Ser
1				5					10					15

Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn
				20					25		

(2) INFORMÁCIÓK AZ 5. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 27
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 5. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Arg	Ser
1				5					10					15

Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn
				20					25		

(2) INFORMÁCIÓK A 6. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 27
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 6. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Trp	Ser
1				5					10					15

(2) INFORMÁCIÓK A 7. SZEKVENCIAHOZ

(A) HOSSZ: 27

(D) **TOPOLÓGIA:** lineáris

Ala Val Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn
20 25

(A) HOSSZ: 27

(D) **TOPOLOGIA:** lineáris

Ile Pro Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn
20 25

(A) HOSSZ: 27

(D) **TOPOLÓGIA:** lineáris

Ile Pro Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn
20 25

(2) INFORMÁCIÓK A 10. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 27
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 10. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Leu	Ser
1				5					10					15
Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Thr	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMÁCIÓK A 11. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 27
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 11. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Phe	Ser
1				5					10					15
Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Thr	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMÁCIÓK A 12. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 27
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 12. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Met	Ser
1				5					10					15
Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Thr	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMÁCIÓK A 13. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 27

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 13. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Ile	Pro	Met	Ser
1				5					10					15
Ile	Pro	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Thr	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMÁCIÓK A 14. SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

(A) HOSSZ: 27

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 14. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Ile	Pro	Leu	Ser
1				5					10					15
Ile	Pro	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Thr	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMÁCIÓK A 15. SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

(A) HOSSZ: 27

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 15. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Lys	Val	Ile	Ser	Ala	Glu
1				5					10					15
Trp	Met	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Thr	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMÁCIÓK A 16. SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

(A) HOSSZ: 27

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 16. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Thr	Met	Phe	Leu	Glu	Ala	Ile	Pro	Met	Ser
1				5					10					15

Ile	Pro	Pro	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Thr	Arg	Phe	Asn
				20					25		

(2) INFORMÁCIÓK A 17. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 27
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 17. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Thr	Met	Phe	Leu	Glu	Ala	Ile	Pro	Met	Ser
1				5					10					15

Ile	Pro	Pro	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Ala	Arg	Phe	Asn
				20					25		

(2) INFORMÁCIÓK A 18. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 27
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 18. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Thr	Met	Phe	Leu	Glu	Ala	Ile	Pro	Met	Ser
1				5					10					15

Ile	Pro	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Thr	Arg	Phe	Asn
				20					25		

(2) INFORMÁCIÓK A 19. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 27
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 19. szekvencia

Arg	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Leu	Ser
1				5					10					15

Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn
				20					25		

(2) INFORMÁCIÓK A 20. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 27
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 20. szekvencia

Thr	Glu	Arg	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Leu	Ser
1				5					10					15

Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn
				20					25		

(2) INFORMÁCIÓK A 21. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 27
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 21. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Arg	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Leu	Ser
1				5					10					15

Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn
				20					25		

(2) INFORMÁCIÓK A 22. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 23
- (B) TÍPUS: aminosav

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 22. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Ile	Pro	Met	Ser
1				5					10					15

Ile	Pro	Pro	Glu	Thr	Arg	Phe	Asn
				20			

(2) INFORMÁCIÓK A 23. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 27

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 23. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Ile	Pro	Arg	Ser
1				5					10					15
Ile	Pro	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMÁCIÓK A 24. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

(A) HOSSZ: 27

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 24. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Met	Pro	Leu	Ser
1				5					10					15
Thr	Gln	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMÁCIÓK A 25. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

(A) HOSSZ: 27

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 25. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Ala	Gly	Arg	Ser
1				5					10					15
Leu	Asn	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMÁCIÓK A 26. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

(A) HOSSZ: 27

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 26. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Val	Ala	Arg	Thr
1				5					10					15
Leu	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMÁCIÓK A 27. SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

(A) HOSSZ: 27

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 27. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Ser	Ala	Arg	Met
1				5					10					15
Ala	Pro	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMÁCIÓK A 28. SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

(A) HOSSZ: 27

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 28. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Met	Ser	Arg	Met
1				5					10					15
Ser	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMÁCIÓK A 29. SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

(A) HOSSZ: 27

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 29. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Phe	Arg	Ser
1				5					10					15
Ala	Arg	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMÁCIÓK A 30. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 27
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 30. szekvencia

Thr	Glu	Ala	Ala	Gly	Ala	Met	Phe	Leu	Glu	Ala	Ile	Pro	Met	Ser
1				5					10					15
Ile	Pro	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Lys	Pro	Phe	Thr			
				20					25					

(2) INFORMÁCIÓK A 31. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 20
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 31. szekvencia

Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Val	Glu
1				5					10					15
Thr	Arg	Thr	Ile	Val										
				20										

(2) INFORMÁCIÓK A 32. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 20
- (B) TÍPUS: aminosav
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 32. szekvencia

Gly	Thr	Met	Phe	Leu	Glu	Ala	Ile	Pro	Met	Ser	Ile	Pro	Pro	Glu
1				5					10					15
Val	Lys	Phe	Asn	Thr										
				20										

(2) INFORMÁCIÓK A 33. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

- (A) HOSSZ: 15

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 33. szekvencia

Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Val	Glu
1				5				10						15

(2) INFORMÁCIÓK A 34. SZEKVENCIÁHOZ

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

(A) HOSSZ:15

(B) TÍPUS: aminosav

(D) TOPOLÓGIA: lineáris

(xi) A SZEKVENCIA LEÍRÁSA: 34. szekvencia

Gly	Thr	Met	Phe	Leu	Glu	Ala	Ile	Pro	Met	Ser	Ile	Pro	Por	Glu
1				5				10						15

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás rekombináns szerin-proteáz inhibitor előállítására, amely képes egy szerin-proteáz aktivitásának módosítására és adott esetben DNS kötésére, *azzal jellemezve, hogy*

i) meghatározzuk egy kiválasztott szerin-proteáz inhibitor szekvenciáját;

ii) azonosítjuk az említett szerin-proteáz inhibitor reaktív hurkát, amely tartalmaz egy első, egy proteáz kötőhely aminosav-szekvenciát és egy második, egy horgonyzóhely aminosav-szekvenciát;

iii) az említett első, proteáz kötőhely aminosav-szekvencia módosításával megváltoztatjuk a rekombináns szerin-proteáz inhibitor szelektivitását más proteázokra nézve;

iv) az említett második, horgonyzóhely aminosav-szekvencia módosításával alkalmassá tesszük a proteáz inhibitort arra, hogy hatékonyan módosítsa a proteáz aktivitását; és

v) szintetizáljuk az említett módosított rekombináns szerin-proteáz inhibitort.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy a második, horgonyzóhely aminosav-szekvenciát kicsi és semleges oldalláncokat tartalmazó aminosavakkal módosítjuk.*

3. Kompozíció szerin-proteáz aktivitás hatékony módosítására, amely egy az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárással előállított rekombináns szerin-proteáz inhibitort tartalmaz.

4. A 3. igénypont szerinti kompozíció alkalmazása gyulladásos folyamatok szabályozására sejtekben vagy szövetekben.

5. Eljárás szerin-proteáz szabályozására, azzal jellemezve, hogy

i) kiválasztunk egy cél-proteázt, amely akkumulálódik a sejtekben vagy szövetekben;

ii) előállítunk egy rekombináns szerin-proteáz inhibitorát egy az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárással;

iii) sejteket vagy olyan szöveteket, amelyekben akkumulálódnak gyulladásos sejtek, a módosított szerin-proteáz inhibitorral érintkeztetve módosítjuk a szerin-proteáz aktivitását.

6. Eljárás szerin-proteáz inhibitorát kódoló génjében feltételezetten olyan mutációt hordozó beteg diagnosztizálására, amely egy szerin-proteáz szabályozatlan aktivitását eredményezi, azzal jellemezve, hogy

i) mintát veszünk egy olyan betegtől, aki feltételezhetően proteáz szabályozatlan aktivitásával jellemezhető állapottal, különösen máj- és tüdőrendellenességgel rendelkezik;

ii) azonosítjuk a szerin-proteáz inhibitorát, amely az említett állapottal kapcsolatos;

iii) detektáljuk az említett szerin-proteáz inhibitorát kódoló génben levő mutációt.

7. Eljárás a gyulladásos folyamatok molekuláris és celluláris mechanizmusának gátlására, valamint sejt- és szö-

vetkárosodás csökkentésére, azzal jellemezve, hogy a sejtet vagy szövetet egy az 1. vagy 2. igénypont szerinti rekombináns szerin-proteáz inhibitor hatékony mennyiségével érintkeztetjük.

8. Humán vad típusú α -1-antikimotripszin analógja, amelyben a vad típusú α -1-antikimotripszin 350. helyzetében levő aminosav alaninra van cserélve, vagy a vad típusú α -1-antikimotripszin 349-368. helyzetében levő Ala-Ala-Thr-Ala-Val-Lys-Ile-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu-Thr-Arg-Thr-Ile-Val aminosav-szekvencia Gly-Thr-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Thr aminosav-szekvenciára van cserélve, vagy a vad típusú α -1-antikimotripszin 349-363. helyzetében levő Ala-Ala-Thr-Ala-Val-Lys-Ile-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu aminosav-szekvencia Gly-Thr-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-Pro-Glu aminosav-szekvenciára van cserélve.

9. Nukleinsav-szekvenciák, amelyek egy a 8. igénypont szerinti, humán vad típusú α -1-antikimotripszin analógját kódolják.

10. Expressziós vektorok, amelyek egy a 9. igénypont szerinti nukleinsav-szekvenciát tartalmaznak.

11. Gazdasejtek, amelyek egy a 9. igénypont szerinti nukleinsav-szekvenciát képesek kifejezni.

12. Sejttenyészetek, amelyek egy a 8. igénypont szerinti humán α -1-antikimotripszin-analógot képesek kifejezni.

13. Protein-készítmények, amelyek egy a 8. igénypont szerinti humán α -1-antikimotripszin-analógot tartalmaznak.

A meghatalmazott:



4. oldal
Bevezet