

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 903931 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 903931

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁵)
C07K 7/10

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 17.11.1989

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 08.08.1990

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 08.08.1990

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 17.11.1989 PCT/EP1989/001389
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

08.12.1988 GB 8828728 27.04.1989 GB 8909681

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Sandoz AG**, Lichtstrasse 35, 4056 Basel, SVEITSI, (CH)

2 • **Theodor Kocher Institut**, Freiestrasse 1 CH-3012 Bern, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Baggiolini, Marco**, Switzerland, SVEITSI, (CH)

2 • **Clemetson, Kenneth John**, Switzerland, SVEITSI, (CH)

3 • **Walz, Alfred**, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Papula Oy, Mechelininkatu 1 a, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Neutrofiiliaktivoiva peptidi-2

Neutrofilaktiverande peptid-2

NEUTROFIILIAKTIVOIVIA PEPTIDI-2 - NEUTROFILAKTIVERANDE
PEPTID-2

Keksintö koskee immuunimoduloivaa ainetta.

5 Erityisesti keksintö koskee immuunistimuloivaa tekijää, joka aktivoi neutrofiilileukosyyttejä, erityisesti ihmisen neutrofiilileukosyyttejä. Tästä käytetään tämän jälkeen nimitystä neutrofiilistimuloiva aktiviteetti 1 (NSA-1) tai, synonyymisesti, neutrofiiliaktivoiva peptidi 2.

10 Neutrofiilileukosyytit (neutrofiilit) ovat tavallisimmat leukosyytit ja lukumäärältään noin 2/3 valkosoluista ihmisen veressä. Niillä on yksi päätehtävä, joka on suojella isäntäorganismia mikrobisilta infektioilta. Neutrofiilit ovat liikkuvia, herkkiä infektioissa muodostuville kemotaktisille ärsykeille, ja pystyvät siirtymään infektoituun kudokseen tappamaan mikro-organismit. Tappaminen riippuu neutrofiilien kyvystä nielaista mikro-organismit ja vapauttaa hap-
15 piradikaaleja ja mikrobeja tappavia entsyymejä. Tällaisen tuotteiden vapauttaminen riippuu neutrofiilien aktivoinnista.

Joitakin tällaisen aktiviteetin omaavia proteiineja tunnetaan, kuten neutrofiiliaktivoiva tekijä
25 (NAF) (P. Peveri et al., J. Exp. Med. 167 [1988] 1547), tunnetaan myös nimellä neutrofiiliaktivoiva peptidi 1 (NAP-1).

Nyt on todettu, että neutrofiilistimuloivaa aktiviteettia tuottaa stimuloidut leukosyytit viljelyssä, ja sitä voidaan ottaa talteen viljelyliemestä. Neutrofiilistimuloivasta aktiviteettista käytetään tässä nimitystä NSA-1 tai synonyymisesti neutrofiiliaktivoiva peptidi-2 (NAP-2).

On myös todettu että NSA-1/NAP-2 on rakenteellisesti hyvin samanlainen kuin β -tromboglobuliini (β -TG), sidekudosta aktivoiva peptidi III (CTAP-III) ja verihiutaleperusproteiini (PBP).

Keksinnön tarkoituksena on tuoda esille NSA-1/NAP-2 tai tämän toimiva muunnos, fragmentti tai johdannainen, jolla on sama biologinen aktiviteetti, esim. muteiini, tarpeeksi puhtaana niin, että sen lähempi tunnistaminen ja valmistaminen esim. rekombinantti-DNA-tekniikalla voidaan tehdä, sekä sen farmaseuttinen käyttö.

Keksintö tuo lisäksi esille menetelmän NSA-1/NAP-2 valmistamiseksi esim. ihmisen veren leukosyytteistä ja/tai verihiutaleista.

Lisäksi se tuo esille NSA-1/NAP-2 käytön neutrofiilileukosyyttien aktivoijana ja lisää täten vastustusta infektioita vastaan.

Se tuo lisäksi esille menetelmän NSA-1/NAP-2 tai tämän toimivan muunnoksen, fragmentin tai johdannaisen, tai tämän biologisesti aktiivisen rakenteellisesti vastaavan aineen, kuten β -TG, CTAP-III tai PEP valmistamiseksi, rekombinantti-DNA-tekniikalla, jossa menetelmässä kloonataan vastaava geeni mukaan lukien luonnollinen johtosekvenssi, esim. luonnollinen, ihmisen verihiuteleissa sisäsyntyinen johtosekvenssi, ilmaistaan se sopivassa isännässä ja sopivasti otetaan talteen peptidituote, jos se on indikoitu käyttämällä sopivaa proteaasia.

Tekstissä käytetään seuraavia lyhennyksiä

BSA	naudan seerumialbumiini;
CTAP-III:	sidekudosta aktivoiva peptidi III;
DDS:	natriumdodesyyilisulfaatti;
DDT:	ditiotreitoli;
30 fMLP:	N-formyyli-L-metionyyli-L-leusyyli-L-fenyylialaniini;
LPS:	lipopolysakkaridi E. colista 055:D5;
MEM:	Eaglen minimaalinen peruskasvualusta (Seromed GmbH, München), täydennettynä 25 μ g/ml neomysiinillä, puskuroitu pH 7,4 25 mM NaHCO ₃ ja 20 mM HEPES;
35 MEM-PPL:	sisältää lisäksi 1 % pastöroitua

		plasmaproteiiniliuosta (5 % PPL-SRK, Sveitsin Punaisen Ristin Laboratorio, Bern, Sveitsi) ja 100 IU/ml penisilliiniä ja streptomysiinia (Gibco AG, Basel, Sveitsi);
5	MoAbs:	monoklonaalisia vasta-aineita;
	mRNA:	lähetti-RNA;
	NAF:	neutrofiiliaktivoiva tekijä (=NAP-1);
	NAP-1:	neutrofiiliaktivoiva peptidi 1 (=
10		NAF);
	NAP-2:	neutrofiiliaktivoiva peptidi 2 (= NSA-1);
	NEM:	N-etyylimaleimidi;
	NSA-1:	neutrofiilistimuloiva aktiviteetti 1
15		(= NAP-2);
	PBP:	verihiutaleperusproteiini;
	PBS:	fosfaattipuskuroitu suolaliuos ilman Ca^{++} ja Mg^{++} ;
	PBS-BSA:	PBS täydennettynä 0,9 mM CaCl_2 , 0,49
20		mM MgCl_2 ja 2,5 mg/ml BSA;
	PRP:	verihiutalerikas plasma;
	PHA-P:	fytohemaglutiniini (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)
	PMN:	liuskatumaisia soluja - neutrofiileja
25	PMSF:	fenyyylimetaanisulfonyylifluoridi;
	SDS-PAGE:	natriumidodesyyli-sulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforees;
	SSPE:	180 mM NaCl; 10mM NaH_2PO_4 ; 1 mM EDTA; pH 7,4;
30	β -TG:	β -tromboglobuliini.

NSA-1/NAP-2 karakterisoidaan biologisesti sen neutrofiili-aktivoivien ominaisuuksien avulla, erityisesti entsyymin vapautusinduktion kautta. Molekylaarisin

35 termein NSA-1/NAP-2 voidaan karakterisoida molekyypainon, joka on likimäärin 7500 ja lasketun isoelektrisen pisteen, joka on likimäärin 8,7, avulla.

Sitä valmistetaan ihmisen veren leukosyyteistä ja/tai verihiutaleista menetelmällä, jossa se puhdistetaan stimuloitujen veren leukosyyttien ja/tai verihiutaleiden viljelynesteestä fosfoselluloosakromatografian ja käänteisfaasikromatografian avulla.

Muista lajeista kuin ihmisestä voidaan NSA-1/NAP-2 valmistaa samalla tavalla vastaavista verileukosyyteistä ja/tai verihiutaleista.

Stimulaatiota voidaan tehostaa jokaisella tunnetulla aineella kuten LPS ja PHA-P.

Fosfoselluloosakromatografia voidaan toteuttaa esim. fosfoselluloosakolonilla, joka on tasapainoitettu kaliumfosfaatti/NaCl/EDTA/glyseroolipuskurilla likimäärin neutraaliin pH, esim. pH 7,2, ja sen jälkeen uuttamalla esim. lineaarilla NaCl-konsentraatiogradientillä samassa puskurissa.

Käänteisfaasikromatografia seuraa edullisesti fosfoselluloosakromatografiaa, ja se toteutetaan edullisesti ensin valmistamalla käänteisfaasi-C4-kolonilla, joka eluoidaan esim. 0 - 80 % asetonitriiligradientillä 0,1 % trifluorietikkahapossa; tämän jälkeen CN-propyylikolonilla, joka eluoidaan esim. 0 - 80 % asetonitriiligradientillä 0,1 % trifluorietikkahapossa; ja tämän jälkeen aktiiviset fraktiot ajetaan uudelleen analyttisellä käänteisfaasi-C4-kolonilla samoissa olosuhteissa, joita käytetään CN-propyylikromatografiassa.

Puhdistusten kulkua voidaan seurata kuvista 1a, 1b ja 1c.

Puhdistusten kulkua seurataan analysoimalla neutrofiilistimuloivaa aktiviteettia, esim. kykynä indusoida elastaasin vapautuminen ihmisen neutrofiileistä, jotka on esikäsitelty sytokalasiini B avulla (B. Dewald ja M. Baggiolini, Biochem. Pharmacol. 36 [1987] 2505-2510).

NSA-1/NAP-2:lla on todettu olevan näennäinen molekyyllipaino noin 6500 20 % urea-SDS-polyakryyliami-

digeelielektroforeesilla. Näennäinen isoelektrinen piste on noin 8,3.

Aminohapposekvenssianalyysi osoittaa (kuva 2), että ensimmäiset 20 N-terminaaliset aminohapot vastaavat tarkoin verihiutaleen perusproteiinin (PBP) sekvenssin yleistä osaa ja sen rakenteellisia johdannaisia CTAP-III (C. W. Castor et al., PNAS 80 [1983] 765-769) ja β -tromboglobuliinia (G. S. Begg et al., Biochemistry 17 [1978] 1739-1744). NSA-1/NAP-2:n aminoterminaali vastaa CTAP-III aminohappoa 16 ja β -TG aminohappoa 12. Pilkkominen karboksipeptidaasin Y kanssa osoittaa, että C-terminaalinen aminohapposekvenssit ovat identtisiä (-Glu-Ser-Ala-Asp). NSA-1/NAP-2 vastaa täysin β -TG sekvenssiä ja koostuu 70 aminohaposta, joilla on laskettu molekyylipaino 7628 ja laskettu isoelektrinen piste 8,7. Kuvassa 4 on osoitettu täydellinen 70 aminohapon sekvenssi. Kokonaishomologia NSA-1/NAP-2 ja NAF/NAP-1 välillä on 46 %. Sekvenssi NSA-1/NAP-2 ei sisällä mitään näennäisiä paikkoja N-glykosylaatiolle. Siinä on potentiaalinen paikka fosforylaatiolle proteiinin kinaasi C (Thr) vaikutuksesta asemassa 39 ja mahdollinen amidaatiopaikka (Asp) asemassa 42.

NSA-1/NAP-2 voidaan täten tarkastella kuin se olisi β -TG:n fragmentti.

NSA-1/NAP-2:n sekvenssin voidaan katsoa vastaavan NAF/NAP-1:tä kahden ensimmäisen cysteinijännöksen perusteella (Cys 5 ja Cys 7 NSA-1/NAP-2 ja Cys 7 ja Cys 9 NAF/NAP-1). Kun ne asetetaan rinnan tällä tavalla, noin puolet NSA-1/NAP-2:n ja NAF/NAP-1:n ensimmäisistä 20 aminohaposta ovat identtisiä. Nämä kaksi tekijää ovat siten läheisesti yhteenkuuluvia ei ainoastaan toiminnallisesti vaan myös tietyssä määrässä rakenteellisesti.

NSA-1/NAP-2:n aminohapposekvenssin saatavillaolo sallii sen valmistamisen myös muilla menetelmillä edellä kuvatun luonnollisesta lähteestä eristämisen lisäksi. Täten, koska peptidi sisältää vain 70 amino-

happoa, kokonaissynteessi on mahdollinen tavanomaiseen tapaan, esim. käyttäen Merrifieldin kiinteän tilan menetelmää ja asianmukaisesti huomioon ottaen kahden disulfididisidoksen läsnäolo.

- 5 Muut valmistusmenetelmät sisältävät rekombinantti-DNA-tekniikoita, esim. vastaavan synteettisen geenin kloonaukseen ja ilmaisu, valinnaisesti kodonioptimoinnin jälkeen. CTAP-III:a koodaavan geenin kemiallinen synteesi ja ilmaisu hiiivassa on selostettu (G. T. Mullenbach et al., J. Biol. Chem. 261 [1986] 719), ja sitä
10 voidaan täten myös soveltaa vastaavien peptidien, kuten NSA-1/NAP-2 valmistamiseen. Kuitenkin vain osalla muodostunutta CTAP-III on biologinen aktiviteetti. Näyttää todennäköiseltä että pääongelma on väärinkäännetty ja
15 virheellisesti muodostunut disulfididisidos. Mitään johtosekvenssiä koodaavaa DNA:ta ei sisällytetty synteettiseen geeniin, koska mitään tällaista johtosekvenssiä ei vielä tunnettu tälle aineryhmälle.

- Vielä eräs valmistusmenetelmä rekombinantti-DNA-tekniikalla on luonnollisen johtosekvenssin sisältävän geenin kloonaukseen ja ilmaisu, esim. luonnollinen johtosekvenssi, joka on endogeeninen ihmisen verihiutaleissa esim. kloonauksella ja ilmaisemalla sopivasta ilmaisukirjastosta valittu cDNA ja koodaamalla NSA-
25 1/NAP-2 tai suurempi peptidi sisältäen NSA-1/NAP-2, kuten β -TG, CTAP-III tai PBP ja ottamalla talteen NSA-1/NAP-2 tavanomaisin menetelmin ilmaisutuotteesta. Tällainen johtosekvenssi on esim. 34 ensimmäistä aminohappoa kuvan 5 mukaisessa sekvenssissä tai tämän toiminna-
30 minnallinen fragmentti tai johdannainen. Esimerkki 7 kuvaa CTAP-III koodaavan cDNA kloonauksella ihmisen verihiutaleesta johdetusta λ gt11 ilmaisukirjastosta. Toivotun peptidituotteen talteenotto suuremmasta alkupeptidistä voidaan esim. tehostaa tarkoituksenmukaisesti
35 katkaisemalla suurempi peptidi tavanomaisin menetelmin proteaasilla kuten seriini proteaasilla.

Tarkoituksenmukainen proteaasi voidaan esim.

eristää tavanomaisella tavalla puhdistetuista monosyyteistä. Ne ovat hyvin herkkiä PMSF:lle, kohtalaisen herkkiä leupeptiinille ja ei-herkkiä EDTA:lle.

Vaihtoehtoisesti johtosekvenssi voidaan liittää suoraan geeniin, joka koodaa toivotun peptidin.

Valmistus luonnollisen johtosekvenssin sisältävän geenin kloonauksen kautta tuottaa peptidituotteita, joilla on oikea laskostus täydellistä biologista aktiviteettia varten, esim. kohdentamiseksi α -jyväsien, kun ilmaistaan ihmisen soluissa.

Toiminnallisia fragmentteja tai johdannaisia esim. NSA-1/NAP-2:n muteiineja voidaan valmistaa tunnetuin menetelmin.

On myös löydetty kolme NSA-1/NAP-2:n muunnosta, joilla on jonkin verran alentunut biolooginen aktiviteetti, ja joilla on kuvassa 4 esitetty 70 aminohapon sekvenssi mutta on pidennetty N-terminaalissa CTAP-III:n 3, 4 ja 5 aminohapolla (kts. kuva 5). Nillä on siis kuvan 4 mukainen sekvenssi, jota edeltää tässä järjestyksessä:

Asp-Leu-Tyr-,
Ser-Asp-Leu-Tyr- ja
Asp-Ser-Asp-Leu-Tyr-

ja jotka ovat 73, 74 ja vast. 75 aminohapon pituisia.

Ne voidaan valmistaa, kuten edellä on selostettu NAP-2:n valmistuksen yhteydessä stimuloituista verileukosyyteistä ja/tai verihiutaleista: stimuloitaessa LPS:lla monosyyttiviljelmin ylikyllästetyn nesteen läsnäollessa, NAP-2:n lisäksi saadaan pienempi välituotepiikki sisältäen NAP-2:n 73 - 75 jäännösmuunnosta. Tämä lisäpiikki muodostaa 65, 20 ja 15 % 74, 75 ja vast. 73 jäännösmuodoista.

NSA-1/NAP-2 ja tämän funktionaaliset muunnokset, fragmentit ja johdannaiset omaavat biologista aktiviteettia tehden ne soveliaiksi käytettäväksi lääkkeinä.

Esimerkiksi ne tuovat esiin neutrofiililitiivis-

tymän rotissa annoksina noin 1 - 100 µg/kg eläimen ruumiinpainosta.

NSA-1/NAP-2 ja funktionaaliset muunnokset, fragmentit ja johdannaiset ovat täten soveliaita käytettäväiksi hoidettaessa tiloja, jotka ovat seurauksena tai johtuvat, paikallisesti tai systeemisesti, PMN:n (liuskatumaiset solut - neutrofiilit) määrän tai aktivoituneen tilan muutoksesta. Ne modifioivat laajalti näitä PMN-parametrejä ja ovat tämän takia soveliaita käytettäväiksi tilojen hoidossa, joissa PMN:n määrän lisäys tai aktivoituneen tilan lisäys johtaa kliiniseen parannukseen, esim. bakteri-, mykoplasma-, hiiva- ja sien- ja viraali-infektioissa. Vielä lisäksi ne ovat soveliaita käytettäväiksi tulehduksellisissa sairauksissa, kuten psoriasis, artriittiset tilat ja astma, tai tiloissa, joissa on epätavallisen matala neutrofiililuku ja/tai on aikaansaatu matala neutrofiilitaso, ja antagonistien esim. monoklonaalivasta-aineiden valmistuksessa käytettäväksi näissä indikaatioissa.

Koska niiden, kuten NAP-1, on osoitettu olevan myös kemotaktisia T-lymfosyyteille, ne ovat soveliaita käytettäväksi myös tietyissä immunopuutostiloissa.

Näihin indikaatioihin sopiva annostus vaihtelee tietenkin riippuen esim. isännästä, antotavasta ja hoidettavan tilan luonteesta ja vaikeudesta. Kuitenkin tavallisesti tyydyttäviä tuloksia on osoitettu saatavan systeemisesti päivittäisellä annostuksella noin 1 - 100 mg/kg eläimen ruumiin painosta. Suuremmille kohteille indikoitu päivittäinen annostus on alueella noin 0,1-100 mg, edullisesti noin 0,1 - 10 mg tavanomaisesti annettuna, esim. jaettuina annoksiin jopa neljä kertaa päivässä.

Farmaseuttiset koostumukset, sisältäen yhdistettyä yhdessä ainakin yhden farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai laimennusaineen kanssa, voidaan valmistaa tavanomaisin menetelmin sekoittaen farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai laimennusaineen kanssa.

Yksikköannosmuodot sisältävät esimerkiksi noin 0,025-50 mg yhdistettä.

Vaikkakin NSA-1/NAP-2 on funktionaalisesti suuressa määrin samanlainen kuin NAP-1, sitä voidaan todennäköisesti valmistaa ainoastaan in vivo, kun PBP ja/tai CTAP-III vapautuvat verihiutaleista, samalla kun NAF/NAP-1 valmistus mononukleaarista fagosyyteistä ja suuresta määrästä kudossoluja saadaan aikaan tulehdussellisella sytokineesilla, kuten kasvainkuoliotekijä ja interleukiini-1. Tämän takia näiden kahden peptidin voidaan otaksua syntyvän erilaisissa fysiologisissa tilanteissa ja eri paikoissa. Verihiutaleesta johdettuna NAP-2:a tuotetaan pääasiassa intravaskulaarisesti, siellä missä verihiutaleaktivaatiota ja aggregaatiota tapahtuu, esim. trombissa ja atheroskleroottisissa vaurioissa, kun taas NAF/NAP-1 muodostuu melkein poikkeukseutta kudoksissa.

NSA-1/NAP-2:ta ja sen muunnoksia ei löydetä verihiutaleista tai muista mononuklaarisoluviljelmän komponenteista, ja se näyttää muodostuvan vapautumisen seurauksena. Ne osoittavat kemotaktisen reseptoriagonistin tyypillisiä ominaisuuksia ja saavat aikaan sytosolista vapaita kalsiummuutoksia, kemiallista vetovoimaa ja esosytosista samalla molaarisella alueella kuin NAF/NAP-1, kun taas PBP, CTAP-III ja PF-4 omaavat vähän jos ollenkaan aktiviteettia 100 - 10000 kertaa suuremmissa pitoisuuksissa. Niiden on odotettu olevan yhtä tehokkaita kuin NAF/NAP-1 ja C5a neutrofiilien tasoitumisessa, ja ne ottavat osaa tukokseen, jossa ne saatavat vetää puoleensa neutrofiileja, jotka ovat sotkeutuneet tukkeutuneiden suonien uudelleen kanavointiin.

Kuvissa

Kuva 1a esittää NSA-1:n preparatiivista käänteisfaasikorkeapainenestekromatografia C4-kolonnilla, ylempi kuva esittää proteiinijakautumaa, OD/226 nm; alempi kuva esittää NSA-1:n aktiviteettia, suhteellista elastasiin vapautumista ihmisen neutrofiileista; kaksi

piikkiä on ilmeisiä: pienempi vastaa NSA-1/NAP-2 ja suurempi vastaa NAF/NAP-1;

kuva 1b esittää NSA-1/NAP-2:n käänteisfaasikorkeapaine-nestekromatografia CN-propyylikolonnilla, yksityiskohdat

5 kuten kuvassa 1a;

kuva 1c esittää NSA-1/NAP-2:n käänteisfaasikorkeapaine-nestekromatografia C4-kolonnilla, yksityiskohdat kuten kuvassa 1a;

kuva 2 esittää NSA-1/NAP-2:n aminoterminalisekvenssiä, 10 ensimmäiset 20 tähdettä on osoitettu, ne vastaavat β -tromboglobuliinin sekvenssin osaa;

kuva 3 esittää NSA-1/NAP-2:n aiheuttamaa esosytoosia sytokalasiini-B-käsitellyissä ihmisen neutrofiileissä, pitoisuus riippuvuus;

15 kuva 4 esittää NSA-1/NAP-2:n aminohapposekvenssiä;

kuva 5 esittää cDNA-sekvenssiä ja seurattua PBP:n pre-kursorin aminohapposekvenssi (alkaa nukleotidilla 103), CTAP-III (alkaa nukleotidilla 130), β -TG (alkaa nukleotidilla 142) ja NSA-1/NAP-2 (alkaa nukleotidilla 20 175); kaksi sisäistä disulfididista ovat merkitty tähdillä ja vast. ruuduilla; oletettu polyadenylaatio-signaali on alleviivattu (nukleotidit 581 - 586).

EcoRI:n tunnistamispaikka on yliviivattu.

Seuraavat esimerkit kuuvaavat keksintöä.

25 Osa 1: NSA-1/NAP-2:n valmistus ihmisen verestä, puhdistus ja tunnistus.

Esimerkki 1: NSA-1/NAP-2:n valmistus ihmisen veren leukosyyttien ja/tai LPS:llä stimuloitujen verihiutaleiden avulla.

30 Antikoaguloitua luovutettua verta, saatu Sveitsin Punaisen Ristin laboratoriosta ja säilytetty 20 h 4 - 10°C käytettiin. Yksitumaisia soluja (koostuen monosyyteistä ja lymfosyyteistä suhteessa noin 1 : 5) eristettiin yksittäisistä kuorista Ficoll-Hypaque gradientteissa (A. Boyum, Scand. J. Immunol. 5 [1976] 9 - 15), 35 ja pestiin MEM:ssä. Pestyt solut 6 kuoresta suspendoitiin uudestaan MEM-PPL:lla (5×10^6 solua/ml) ja kasva-

tettiin 20 h 1 µg/ml LPS:n läsnäollessa sekoituslaitteella varustetuissa lasipulloissa. Eri aikoina kasvatusaineen alikvooteista otettiin näytettä, ja neutrofiilistimuloiva aktiviteetti määritettiin kapasiteettina saada aikaan elastaasin vapautuminen ihmisen sytokalasiinilla B esikäsitellyistä neutrofiileistä (B. Dewald ja M. Baggiolini, Biochem. Pharm. 36 [1987] 2505-2510). Tämä koe tunnistaa NSA-1:n kuten myös NAF:n, aikaisemmin selostettu neutrofiiliaktivointitekijä (P. Peveri et al., J. Exp. Med. 167 [1988] 1547-1559). Neutrofiilistimuloiva aktiviteetti lisääntyi ajan mukana ja tasoittui 24 - 28 h kuluttua.

Esimerkki 2: NSA-1/NAP-2:n valmistus ihmisen veren leukosyyttien ja/tai PHA-P:lla stimuloitujen verihiutaleiden avulla

Antikoaguloitua luovutettua verta, saatu Sveitsin Punaisen Ristin laboratoriosta ja säilytetty 20 h 4 - 10 °C käytettiin. Yksitumaisia soluja (koostuen monosyyteistä ja lymfosyyteistä suhteessa noin 1:5) eristettiin yksittäisistä kuorista Focoll-Hypaque gradientteissa (Boyum, 1976), ja pestiin MEM:ssa. Pesty solut 6 kuoresta suspendoitiin uudestaan MEM-PPL:lla (5×10^6 solua/ml) ja kasvatettiin 20 h 1 µg/ml PHA-P:n läsnäollessa sekoituslaitteella varustetuissa lasipulloissa. Eri aikoina kasvatusaineen alikvooteista otettiin näytteitä, ja neutrofiilistimuloiva aktiviteetti määritettiin kapasiteettina saada aikaan elastaasin vapautuminen ihmisen sytolasiinilla B esikäsitellyistä neutrofiileistä. Neutrofiilistimuloiva aktiviteetti lisääntyi ajan mukana ja tasoittui 24 - 48 h kuluessa.

Esimerkki 3: NSA-1/NAP-2:n puhdistus LPS:n stimuloitujen ihmisen veren leukosyyttien ja/tai verihiutaleiden kasvatusnesteistä.

(a) Fosfoselluloosakromatografia

700 ml annoksia ihmisen leukosyyttien soluvaapaata kasvatusnestettä, stimuloitu kuten esimerkissä 1 on selostettu laitettiin suoraan 15 ml fosfoselluloosa-

kolonniin (Whatman P11), joka oli tasapainotettu puskurilla A (20 mM kaliumfosfaattipuskuri, pH 7,2, sisältäen 20 mM NaCl, 1 mM EDTA ja 5 % glyserolia). Kolonni pestiin samalla puskurilla ja eluoitiin tämän jälkeen
 5 (24 ml/h) 120 ml lineaarisella NaCl-konsentraatiogradientilla (0,02 - 1,5 M) puskurissa A. Fraktioiden neutrofiili-stimuloiva aktiviteetti analysoitiin.

b) Käänteisfaasi-kromatografia

Aktiiviset fosfoselluloosakromatografiaerotuksesta
 10 saadut fraktiot yhdistettiin ja lisäpuhdistettiin ajamalla ne 4 kertaa suurihuokosen valmistavan käänteisfaasi-C4-kolonnin (10 x 250 mm, 7 µm, Macherey-Nagel, Dueren, FRG) lävitse. Kolonni uutettiin 2 ml/min gradientilla 0 - 80 % asetonitriilia 0,1 % trifluori-
 15 etikkahapossa lisäyksellä 0,66 % /min.

Aktiiviset fraktiot, joiden retentioaika oli 20 - 26 min yhdistettiin, väkevöitiin Speed Vac-sentrifugaalilla ja ajettiin analyyttiseen käänteisfaasi-CN-propyylikolonniin (4,6 x 250 mm, 5 µm, suurihuokonen, Baker
 20 Research Products, Phillipsburg, N.J., USA). Kolonni uutettiin 0,5 ml/min gradientilla 0 - 80 % asetonitriilia 0,1 % trifluori-
 ... etikkahapossa lisäyksellä 0,66 %/min. Aktiiviset fraktiot, joiden retentioaika oli 22 - 25 min, yhdistettiin, väkevöitiin ja ajettiin uudestaan
 25 analyyttisellä käänteisfaasi-C4-kolonnilla (4,6 x 250 mm, 5 µm, suurihuokonen, Baker Research Products) edellä CN-propyylikolonnille selostetuissa olosuhteissa. Aktiiviset fraktiot, joiden retentioaika oli 42,5 min, kuivattiin Speed Vac-sentrifugaalissa, suspendoitiin
 30 uudestaan steriiliin veteen ja johdettiin tämän jälkeen kaasufaasi sekvenssianalyysiin ja biologiseen testaukseen. Kuva 1 esittää NSA-1/NAP-2:n erotuksen NAF/NAP-1:sta ja aminohapposekvenssianalyysiin käytettyjä fraktioita.

35 Esimerkki 4: Puhdistetun NSA-1/NAP-2:n geelielektroforeesi

Puhdistettu NSA-1/NAP-2 analysoitiin 20 % urea-

SDS polyakryyliamidigeelillä B. Kadenbach et al (Analyt. Biochem. 129 [1983] 517 - 521) mukaan. Yksi ainoa nauha, jolla oli näennäinen molekyylipaino 6500, saatiin tekemällä se näkyväksi hopeavärjäyksellä. NAP-2 liikkuu
5 vähän nopeammin kuin NAF/NAP-1.

Esimerkki 5: NSA-1/NAP-2:n aminohapposekvenssin analyysi

Aminohapposekvenssianalyysi tehtiin automatisoidulla fenyyli-isotiosyanaattihajotuksella käyttäen yhtiön Biosystems kaasufaasisekventoijaa malli 477 A.
10 NSA-1/NAP-2:n (500 pMol) näytteet analysoitiin suoraan tai kemiallisen modifikaation jälkeen. Pelkistys ja alkylaatio suoritettiin seuraavasti: 1 nMol NSA-1/NAP-2 laimennettiin 150 µl 6 M guanidiinihydrokloridiin, 2 mM EDTA, 0,2 M Tris-HCl, pH 8,3, tämän jälkeen lisättiin
15 225 nl tributyylifosfiinia 15 µl asetonitriilissä, ja liuos kasvatettiin huoneen lämpötilassa. 60 min jälkeen lisättiin 160 nl 4-vinyylipyridiiniä 10 µl asetonitriiliä. 30 min jälkeen lisättiin sama määrä tributyylifosfiinia ja vinyylipyridiiniä, ja reaktiota jatkettiin
20 vielä 40 min typpisuojausessa. Liuos tehtiin happamaksi trifluorietikkahapolla, pH 2,0 ja suola erotettiin käänteisfaasi HPLC:lla 0,1 % trifluorietikkahapossa asetonitriiligradientilla.

Karboksiterminaali määriteltiin 0,5 nmol NAP-
25 2:lla ja 0,4 µg karboksipeptidaasilla P tai karboksipeptidaasilla Y (sekventointilaatu, Boehringer) kanssa.

Kuvassa 2 on esitetty ensimmäisen 20 aminoterminaalin aminohappoanalyysi

Esimerkki 6: NSA-1/NAP-2:n neutrofiiliaktivointiteho

Neutrofiilejä eristettiin ihmisen verestä, suspendoitiin PBS/BSA:an ja käytettiin tämän jälkeen NSA-1/NAP-2:n kapasiteetin määrittämiseen elastaasin vapauttamiseksi käyttäen Dewaldin ja Bagglionin (1987) mikrotiiterilevykoemenetelmää. NSA-1/NAP-2 aiheuttaa selektiivisen elastaasin vapautumisen pitoisuudesta riippuvalla tavalla. Pitoisuuden riippuvuus oli samanlainen kuin NAF/NAP-1:lla todettiin ja kyky oli noin puolet
35

NAF:n ja noin kolmasosa fMLP:n vastaavasta kyvystä.

Kuvassa 3 on esitetty NSA-1/NAP-2:n pitoisuudesta riippuva aktiviteetti.

Osa II: Ihmisen verihiutaleesta johdetun λ gt11 ilmaisu-
5 tiedoston CTAP-III:ia koodaavan cDNA:n kloonauks

Esimerkki 7:

(a) Verihiutaleiden eristys ja pesu.

10 Verihiutaleita eristettiin sitraatti-käsittelystä verestä linkoamalla 160 g 10 min, jolloin saatiin verihiutalerikas plasma (PRP) ja vielä lisälinkousvaihe 1100g 10 min, jolloin saatiin verihiutalepelletti. Verihiutaleet pestiin tämän jälkeen kahdesti 30 mmol/l glukosilla, 120 mmol/l NaCl, 129 mmol/l natriumsitraat-
15 tilla, 10 mmol/l EDTA pH 6,5, ja kerran 10 mmol/l Tris/-HCl, 154 mmol/l NaCl, 10 mmol/l EDTA pH 7,4.

b) Ihmisen megakaryosyyttejä

Nämä eristettiin sellaisen potilaan perifeerisestä verestä, jolla oli megakaryoblastinen leukemia
20 Ficoll-metritsoaattigradienttitiheyslinkouksella. Näiden leukemiasolujen megakaryoblastinen fenotyyppi perustuu niiden reaktiviteettiin verihiutale-GPIIb-vastaisten monoklonaalisten vasta-aineiden (MoAbs), GBIb/GPIIIa-kompleksiin ja (vWF) von Willebrand tekijän kanssa.
25 cDNA-koe verihiutale-GPIb:a varten antoi myös positiivisen signaalin 2,4 kb lähetti-RNA:n (mRNA) kanssa (saman kokoinen kuin verihiutaleissa) Northern blotting:ssa näiden solujen mRNA:n kanssa.

30 c) Vasta-aineiden valmistus

Pestyt verihiutaleet solubilisoitiin 1 % Triton X-114:ssa N-etyylimaleimidin (NEM) ja fenyyylimetaanisulfonyylifluoridin läsnäollessa (PMSF, liuotettuna metanoliin) lopullinen pitoisuus 2 mmol/l, ja faasijako
35 suoritettiin, kuten on kuvattu julkaisussa Biochim. Biophys. Acta 778 (1984) 463. Vesifaasi käytettiin eksklusiokromatografiaan ACA-34 Ultrogel (LKB) 0,1 %

natriumdodesyyilisulfaatissa (DDS), 0,1 mol/l NH_4HCO_3 , pH 7,4. Fraktio sisältäen proteiineja 8- - 9- Kd-alueella, kuten arvioitiin natriumdodesyyilisulfaattipolyakryyliamidi-geelielektroforeesissa (SDS-PAGE), käytettiin kaniinien immunisointiin.

(d) Immunovärjäys

Pestyjä verisoluja stimuloitaessa trombiinilla (2 U/4 x 10^6 /ml, 5 min, 37°C) ylikyllästetystä liuoksesta saatujen ja uudelleen kiteytyneitä tuotteita käsiteltiin 2 mmol/l PMSF ja 2 mmol/l NEM kanssa. Ne solubilisoiitiin 1 % SDS:ssa, pelkistettiin 0,1 % ditioneitolilla (DTT), ja erotettiin 20 % SDS-PAGE:lla, jota seurasi elektroforeettinen siirto nitroselluloosaan (BA 85, Schleicher & Schuell, Feldbach, Sveitsi) puolikuvalla sähkövärjälaitteella, 150 mA 90 min. Inkuboinnin jälkeen kanin polyklonaalisella vastaseerumilla anti-CTAP-III käytettiin vuohen anti-kani toista vasta-ainetta liitettynä alkaaliseen fosfataasiin (Bio-Rad Laboratories, Glattdbrugg, Sveitsi) käytetään värjäykseen substraateilla nitrosinisen tetratsolium ja 5-bromi-4-kloori-3-indolyylifosfaatti.

(e) cDNA ilmaisutiedoston muodostaminen

Verihiutaleiden kokonais RNA valmistettiin 180 l verestä käyttäen guanidinihydrokloridimenetelmää. PolyA mRNA eristettiin oligo(dT)selluloosa affiniteettikromatografiolla (Pharmacia, Uppsala, Ruotsi). Ensimmäinen säie syntetisoitiin käyttäen oligo(dT)primääria (Pharmacia P-L Biochemicals) ja käänteistranskriptasaa (Bethesda Research Laboratories, Gibco, Basel, Sveitsi). Toinen säie valmistettiin RNase H (New England Biolabs, Schwalbach bei Frankfurt, Saksa) ja Escheria coli DNA polymeraasi I (Boehringer Mannheim, Rotkreutz, Sveitsi) avulla. Sen jälkeen, kun oli muodostettu tylppiä päitä T4 DNA-polymeraasin ja Klenow-entsyymin kanssa, EcoRI-metylaation ja ligaation EcoRI sidoksien avulla, saatu cDNA pakattiin λ gt11 pakkaus-tiivisteksi (Gigapack Gold, Stratagene, San Diego, CA)

ja kuvattiin E. coli y1088:ssa.

(f) Tiedoston selaaminen ja positiivisten kloonien karakterisointi

Verihiutale λ gt11 cDNA ilmaisutiedostoa selat-
 5 tiin standardimenetelmin polyklonaalisella kanin vas-
 taseerumilla. E. coli spesifiset vasta-aineet poistet-
 tiin immunoabsorptiolla E. coli:n BNN97 nitroselluloo-
 saa-sitovalla lysaatilla. Positiivisia rekombinanttifaga-
 10 geja osoitettiin samalla toisella vasta-aineella ja
 kromogeenisella substraatilla kuin immunovärjäyksessä.
 Puhdistuksen jälkeen λ -DNA pilkottiin EcoRI:lla (Boeh-
 ringer Mannheim) ja insertit eristettiin 0,8 % agarosi-
 geelielektroforeesilla ja elektroosiuoinnilla Bio-
 Trap:ssa (Schleicher & Schuell). DNA saostettiin etano-
 15 lilla ja ligatoitiin 5 ng EcoRI:lla, joka oli lineari-
 soitu M13 Bluescript:lla (Stratagene) käyttäen ligaasia
 T4 (Bio-Lab) ja transfektoitiin E. coliin JM 101. Val-
 koisista pesäkkeistä testattiin positiiviset rekombi-
 nanttiplasmidit alkaalisella uuttamismenetelmällä, ja
 20 yksittäissäikeisiä cDNA-malleja valmistettiin infektoi-
 malla apufagilla M13K07. Molempien säikeiden DNA-sek-
 venssi määriteltiin dideoksiketjuterminointimenetelmällä
 käyttäen Sequenase Kit:a (United States Biochemical
 Corporation) ja 32 S α -merkittyä dATP:ia (New England
 25 Nuclear, Du Pont).

g) Northern värjäysanalyysi

1 % agarosi geelissa tehdyn elektroforeesin
 jälkeen mRNA värjättiin Hybond:lla (Amershamn) ja hybri-
 disoitiin sulfonyloidulla cDNA-koettimella, 68°C, 18 h,
 30 4 x SSPE, 0,1 % $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 0,2 % SDS, 0,5 mg/ml hepariinia
 sisältäen 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lohen maidin DNA:ta. 2 x 5 min pesun
 jälkeen 1 x SSPE:ssa, 1 % SDS, 0,1 % $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, huoneen-
 lämpötilassa ja 2 x 30 min 0,2 x SSPE:ssa, 0,1 % SDS,
 0,1 % $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 68°C, osoitettiin vastaava mRNA immuno-
 35 värjäyksellä hiiren monoklonaalisella vasta-aineella
 (MoAB; Sigma, Deisenhofen, Saksa) sulfonyloitua DNA
 vastaan ja vuohen antihiiri Ige toinen vasta-aine kon-

jugoituna alkaliseen fosfataasiin. Substraatit olivat samat kuin edellä.

(h) Tuloksia

Polyklonaaliset vasta-aineet, jotka muodostuivat immunisoimalla kaneja geelisuodatusfraktiolla, joka sisälsi verihiukkasen vesiliukoisia proteiineja 8 - 9 kd-alueella, osoittivat suurta taipumusta ja spesifiteettiä immuunovärjäyksessä, ja niitä käytettiin verihiukkasesta johdetun λ gt11 cDNA ilmaisutiedoston seulontaan. Kaksi positiivista kloonia 100000 alussa seulotusta rekombinanttifagista täpläpuhdistettiin, ja kaksi sisäpuolista EcoRI-fragmenttia kloonattiin M13 Bluescript[®]:iin. Molempien säikeiden nukleotidisekvenssit määritettiin dideoksi-ketjuterminointi-menetelmällä. Saatiin täysipitkä cDNA-klooni (λ CI) (kuva 5), jossa oli 690 emäsparia sisältäen 66 emäsparin 5' ei-koodaavan alueen, proteiinia koodaava avoin lukukehys, jossa oli 128 aminohappotähdettä (13 894 da), ja 3' ei-koodaava alue sisältäen päatekodonin (TAA), oletettu polyadenyilaatio-signaali, ja polyA-häntä. Toinen klooni (λ C2), joka alkaa vastaavassa asemasta -9, osoitti aivan samanlaisen nukleotidisekvenssin.

Konsensussekvenssi translaation aloitusta varten eukaryoottisessa mRNA:ssa (5' CCACCAUGA 3') alkaa nukleotidissa -5.

mRNA:n Northern värjäyshybridisaatio megakaryosyyttisen leukemian solulinjasta, megakaryosyyteistä, ja verihiutaleista mutta ei hepatosyyttikontrollista antoi positiivisen signaalin suunnilleen kohdassa 0,8 kb CTAP-III:n prekursorin mRNA kanssa viitaten siihen, että vastaava cDNA on täysipitkä. Mitään signaalia ei saatu HEL mRNA:lla, mahdollisesti johtuen cDNA koettimen ei radioaktiivisen merkintämenetelmän matalasta herkkyydestä ja/tai käytetyn HEL-solulinjan matalasta CTAP-III-spezifisestä mRNA-sisällöstä.

Päätelty aminohapposekvenssi (kuva 5) on aivan samanlainen kuin hyvin tunnettu ihmisen verihiutaleen

CTAP-III sekvenssi. Aminotermiinaali CTAP-III on amino-
happoasemassa 44 translatoidussa sekvenssissä, ja sen
mitogeenisesti inaktiivi plasmiinin alku tai trypsiinin
hajoamistuote β -tromboglobuliini on neljä jäännöstä
5 alaspäin asemassa 48. Näiden proteiinien prekursorin,
PBP, on näytetty jakavan ensimmäiset kymmenen CTAP-III:n
tähdettä, mutta sen aminopääte on yhdeksän tähdettä
ylöspäin asemassa 35. Kaikki tunnettu rakenteellinen
informaatio näistä kolmesta proteiinista sopii tarkal-
10 leen aminohapposekvenssiin, joka on saatu koodaavasta
cDNA-kloonista antaen vahvan todisteen yhdelle ainoalle
prekursorille kaikille kolmelle proteiinille.

Täten CTAP-III:n 34 aminohapon johtosekvenssi,
joka on esitetty kuvassa 5 ja on poikkeuksellisen pitkä,
15 eroaa klassisista signaaliptideistä ja on todennäköi-
sesti vastuussa kohdennettaessa proteiini märkivien
megakaryosyyttien α -jyväsiin.

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Neutrofiiliaktivoiva peptidi-2 (NAP-2) tai sen funktionaalinen muunnos, fragmentti tai johdannainen.

5 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen tekijä, jolla on seuraava 70 aminohapon sekvenssi:

	1	5	10
	Ala-Glu-Leu-Arg-Cys-Met-Cys-Ile-Lys-Thr-		
10	11	15	20
	Thr-Ser-Gly-Ile-His-Pro-Lys-Asn-Ile-Gln-		
	21	25	30
15	Ser-Leu-Glu-Val-Ile-Gly-Lys-Gly-Thr-His-		
	31	35	40
	Cys-Asn-Gln-Val-Glu-Val-Ile-Ala-Thr-Leu-		
	41	45	50
20	Lys-Asp-Gly-Arg-Lys-Ile-Cys-Leu-Asp-Pro-		
	51	55	60
	Asp-Ala-Pro-Arg-Ile-Lys-Lys-Ile-Val-Gln-		
25	61	65	70
	Lys-Lys-Leu-Ala-Gly-Asp-Glu-Ser-Ala-Asp		

tai sen funktionaalinen muunnos, fragmentti tai johdannainen.

30 3. Menetelmä NSA-1/NAP-2:n valmistamiseksi, tunnettu siitä, että stimuloitujen veren leukosyyttien viljelyneste puhdistetaan fosfoselluloosakromatografialla ja käänteisfaasikromatografialla.

35 4. Menetelmä NSA-1/NAP-2:n toisen funktionaalisen muunnoksen, fragmentin tai johdannaisen tai sen biologisesti aktiivisen rakenteellisesti vastaavan tuotteen, kuten β -TG, CTAP-III tai PBP valmistamiseksi,

t u n n e t t u siitä, että vastaava geeni mukaan lukien luonnollinen johtosekvenssi kloonataan, geeni ilmennetään sopivassa isännässä ja peptidituote otetaan talteen sopivalla tavalla, tarvittaessa käyttäen sopivaa proteaasia.

5 5. Farmaseuttinen koostumus, joka sisältää patenttivaatimuksen 1 mukaisen tekijän tai tämän funktionaalisen muunnoksen, fragmentin tai johdannaisen yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai laimennusaineen kanssa.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen tekijä tai tämän funktionaalinen muunnos, fragmentti tai johdannainen käytettäväksi farmaseuttisena aineena.

7. Johtopeptidi jolla on seuraava aminohap-
15 posekvenssi:

	1	5	10
	MET-Ser-Leu-Arg-Leu-Asp-Thr-Thr-Pro-Ser-		
	11	15	20
	Cys-Asn-Ser-Ala-Arg-Pro-Leu-His-Ala-Leu-		
	21	25	30
20	Gln-Val-Leu-Leu-Leu-Leu-Ser-Leu-Leu-Leu-		
	31		
	Thr-Ala-Leu-Ala-		

25 tai sen funktionaalinen muunnos, fragmentti tai johdannainen.

8. Hoitomenetelmä, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä annetaan patenttivaatimuksen 1 mukainen tekijä tai sen funktionaalinen muunnos, fragmentti tai johdannainen hoidon tarpeessa olevalle kohteelle.

30 9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen tekijä tai sen funktionaalinen muunnos, fragmentti tai johdannainen, joka on saatu patenttivaatimuksen 3 ja 4 mukaisen menetelmän avulla.

35 10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen tekijä tai tämän funktionaalinen muunnos, fragmentti tai johdannainen, t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu β -TG:sta, CTAP-III:sta tai PBP:sta tai geenistä, joka

koodaa β -TG:a, CTAP-III:a -tai PBP:a.

FIG. 1a

1/7

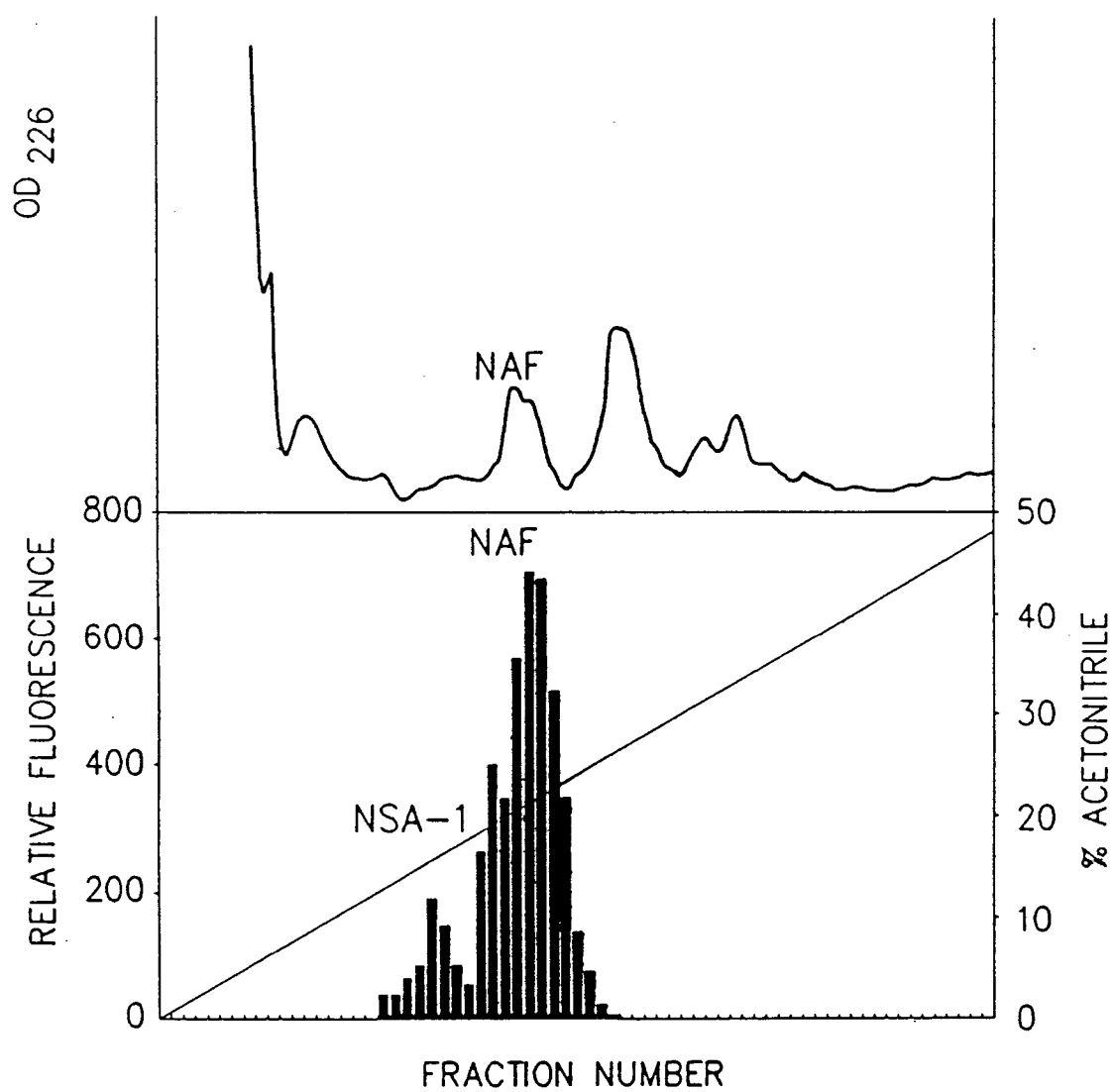


FIG. 1b

2/7

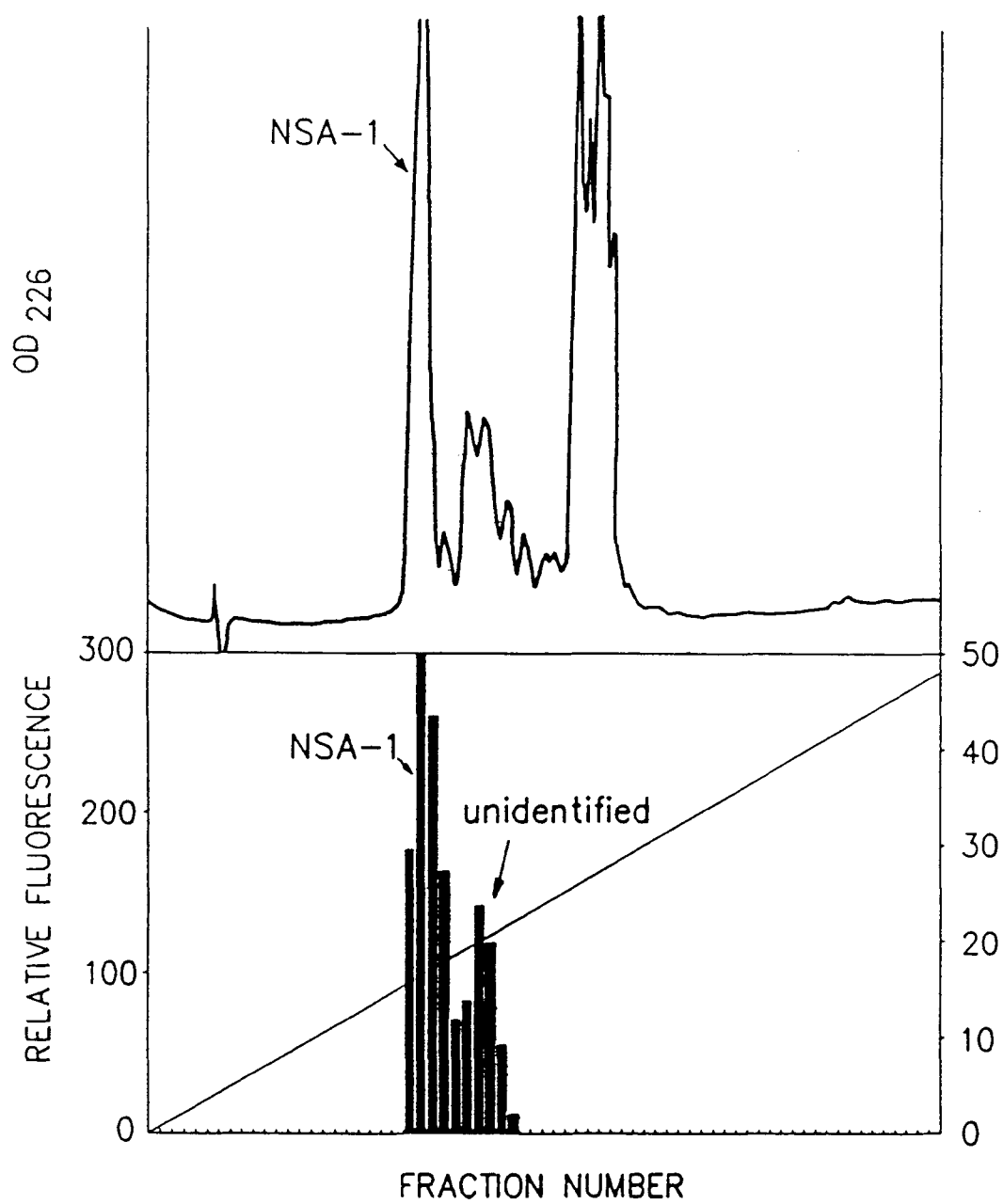


FIG. 1c

3/7

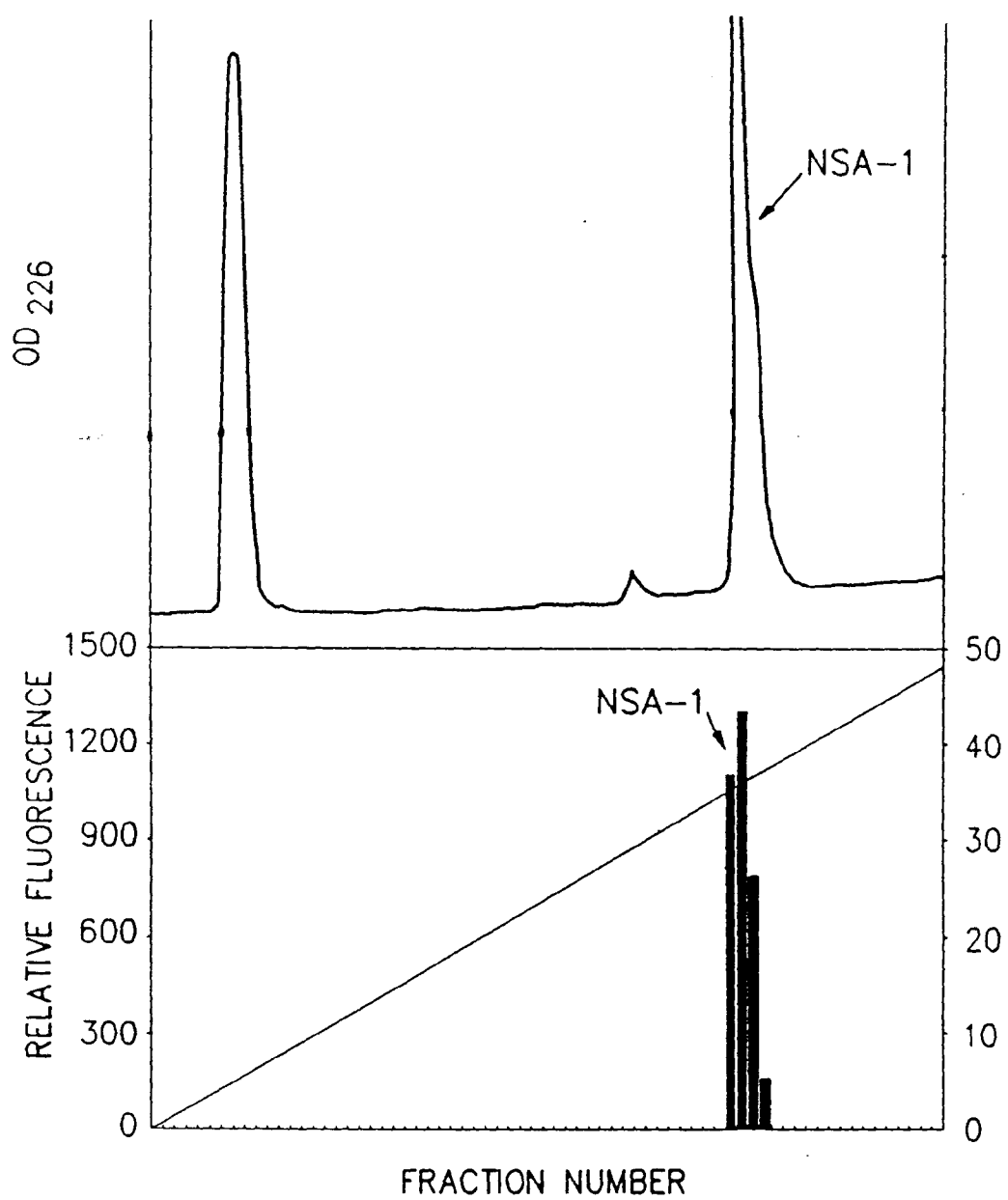


Figure 2

4/7

¹Ala-Glu-Leu-Arg-Cys⁵-Met-Cys-Ile-Lys¹⁰-Thr-
¹¹Thr-Ser-Gly-Ile¹⁵-His-Pro-Lys-Asn-Ile²⁰-Gln-

FIG. 3

5/7

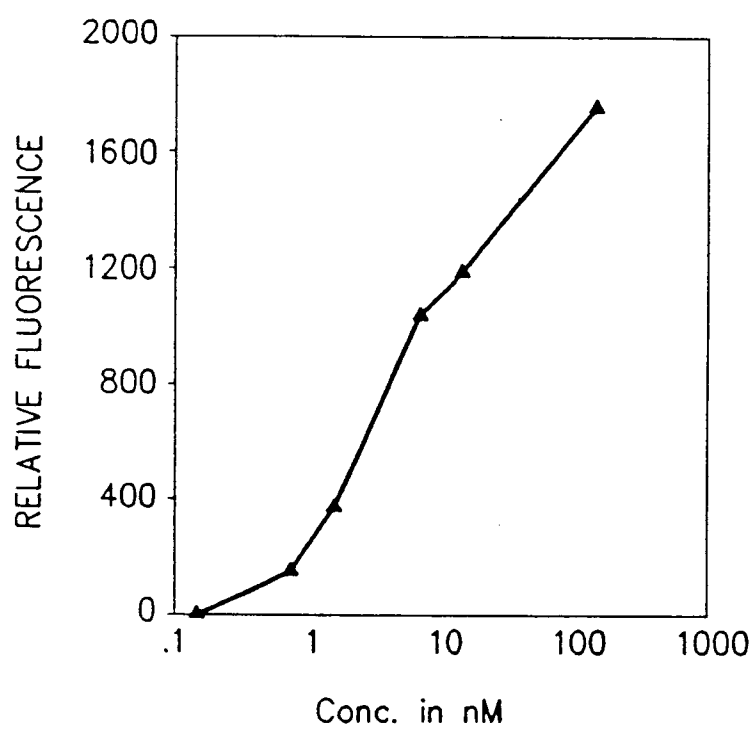


Figure 4

6/7

1	5	10
Ala-Glu-Leu-Arg-Cys-Met-Cys-Ile-Lys-Thr-		
11	15	20
Thr-Ser-Gly-Ile-His-Pro-Lys-Asn-Ile-Gln-		
21	25	30
Ser-Leu-Glu-Val-Ile-Gly-Lys-Gly-Thr-His-		
31	35	40
Cys-Asn-Gln-Val-Glu-Val-Ile-Ala-Thr-Leu-		
41	45	50
Lys-Asp-Gly-Arg-Lys-Ile-Cys-Leu-Asp-Pro-		
51	55	60
Asp-Ala-Pro-Arg-Ile-Lys-Lys-Ile-Val-Gln-		
61	65	70
Lys-Lys-Leu-Ala-Gly-Asp-Glu-Ser-Ala-Asp		

Figure 5

7/7

-66 1C1 -1 1C2
 GGGCAACTCACCCCTCACTCAGAGGTCTTCTGGTTCTGGAACAACCTCTAGCTCAGCCTTCTCCACC

1 54
 ATG AGC CTC AGA CTT GAT ACC ACC CCT TCC TGT AAC AGT GCG AGA CCA CTT CAT
 MET Ser Leu Arg Leu Asp Thr Thr Pro Ser Cys Asn Ser Ala Arg Pro Leu His

55 103
 GCC TTG CAG GTG CTG CTG CTT CTG TCA TTG CTG CTG ACT GCT CTG GCT TCC TCC
 Ala Leu Gln Val Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Thr Ala Leu Ala Ser Ser
 P3P

109 162
 ACC AAA GGA CAA ACT AAG AGA AAC TTG GCG AAA GGC AAA GAG GAA AGT CTA GAC
 Thr Lys Gly Gln Thr Lys Arg Asn Leu Ala Lys Gly Lys Glu Glu Ser Leu Asp
 CTAP-III BTG

163 215
 AGT GAC TTG TAT GCT GAA CTC CGC TGC ATG TGT ATA AAG ACA ACC TCT GGA ATT
 Ser Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile
 NRP-2

7 270
 CAT CCC AAA AAC ATC CAA AGT TTG GAA GTG ATC GGG AAA GGA ACC CAT TGC AAC
 His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn

271 324
 CAA GTC GAA GTG ATA GCC ACA CTG AAG GAT GGG AGG AAA ATC TGC CTG GAC CCA
 Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu Asp Pro

325 373
 GAT GCT CCC AGA ATC AAG AAA ATT GTA CAG AAA AAA TTG GCA GGT GAT GAA TCT
 Asp Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser

379 447
 GCT GAT TAATTTGTTCTGTTTCTGCCAACTTCTTTAACTCCCAGGAAGGGTAGAATTTTGAAACCTTG
 Ala Asp TER

448 518
 AT TCTAGAGTTCTCATTATTTCAGGATACCTATTCTTACTGTATTAAAAATTTGGATATGTGTTTCATTC

519 589
 TGTCTCAAAAATCACATTTTATTCTGAGAAGGTTGGTTAAAAGATGGCAGAAAGAAGATGAAAAATAAATAA

590 624
 GCCTGGTTTCAACCCTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

TUTKIMUSRAPORTTI

KÄÄNNÄ!

