



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **302477**

(13) B1

(51) Int Cl⁶ C 07 K 14/81, C 12 N 15/15

Patentstyret

(21) Søknadsnr	881670	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	19.08.87, PCT/US87/02053
(22) Inng. dag	18.04.88	(85) Videreføringsdag	18.04.88
(24) Løpedag	19.08.87	(30) Prioritet	19.08.86, US, 897990
(41) Alm. tilgj.	17.06.88		
(45) Meddelt dato	09.03.98		

(73) Patenthaver	Scripps Clinic and Research Foundation, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037-1093, US
(72) Oppfinner	David J. Loskutoff, Solana Beach, CA, US Tor Ny, Umeå, SE Michael Sawdey, La Jolla, CA, US
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, 0306 Oslo

(54) **Benevnelse** **Hovedsakelig ren, rekombinant humanendotelplasminogenaktivatorinhibitor, PAI-1, biologisk rent DNA-molekyl som koder for inhibatoren, samt ikke-kromosomal ekspresjonsvektor som koder for og kan uttrykke et PAI-1-gen**

(56) **Anførte publikasjoner** US 4235960
 Åstedt et al. (1985), Thromb. Haemostasis, 53, 122
 Sawdey og Loskutoff (1986), Thrombosis Research, 41:151-160
 Erickson et al. (1984), J. Clin. Invest., 74:1465-1472,
 CA 101:5175z, CA 102:1353d, CA 103:13267v, CA 105:149050k,
 CA 106:133035u

(57) **Sammendrag** Biologisk reagens og diagnostisk system for påvisning og kvantifisering av endotel-plasminogenaktivatorinhibitor (PAI) som er hovedsakelig ren, rekombinant human endotel-PAI, dens biologisk rene gen og en vektor for kloning av genet, og uttrykking av et genprodukt.

Teknisk område

Foreliggende oppfinnelse vedrører en hovedsakelig ren, rekombinant humanendotelplasminogenaktivatorinhibitor, PAI-1, biologisk rent DNA-molekyl som koder for endotel-plasminogenaktivatorinhibitoren PAI-1, og ikke-kromosomal ekspresjonsvektor som koder for og kan uttrykke et PAI-1-gen.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Endotelceller fører hulromsoverflaten i blodkaret og antas å spille en aktiv rolle i den spesifikke proteolyttiske nedbrytning av lokalt avsatt fibrin, Todd, J. Pathol. Bacteriol., 78, 281 (1959); Astrup, i Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Davidson et al. red., vol. 3, s. 1-57, Raven Press, New York (1978). Endotelets styrke når det gjelder å initiere og kontrollere denne prosess fremheves ved dets kapasitet til å syntetisere og frigjøre plasminogenaktivatorer (PA-er), Loskutoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 74, 3903 (1977); Shepro et al., Thromb. Res., 18, 609 (1980); Moscatelli et al., Cell, 20, 343 (1980); Laug, Thromb. Haemostasis, 45, 219 (1981); Booyse et al., Thromb. Res., 24, 495 (1981), inkludert molekyler både av vevtype og urokinasetype, Levin et al., J. Cell Biol., 94, 631 (1982); Loskutoff et al., Blood, 62, 62 (1983). Endotelceller kan også produsere inhibitorer for fibrinolyse, Loskutoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 74, 3903 (1977); Levin et al., Thromb. Res., 15, 869 (1979); Loskutoff et al., J. Biol. Chem., 256, 4142 (1981); Dosne et al., Thromb. Res., 12, 377 (1978); Emeis et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 110, 392 (1983); Loskutoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 80, 2956 (1983); Levin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 80, 6804 (1983).

Selv om disse inhibitorene sannsynligvis tjener viktige regulatorroller når det gjelder å kontrollere det

fibrinolyttiske system i blodkarveggen, er det kjent lite om deres spesifisitet, virkningsmåte eller biokjemiske natur. Den konklusjon at disse inhibitorer i virkeligheten syntetiseres av endotelceller, forstyrres noe av nyere rapporter om at dyrkede celler kan binde og oppta i sitt indre protease-inhibitorer fra serumholdig dyrkningsmedium, Cohen, J. Clin. Invest., 52, 2793 (1973); Pastan et al., Cell, 12, 609 (1977); Rohrllich et al., J. Cell Physiol., 109, 1 (1981); McPherson et al., J. Biol. Chem., 256, 11330 (1981).

Muligheten for å fremstille forholdsvis ubegrensede mengder av vevtype-plasminogenaktivator (t-PA) ved hjelp av rekombinant DNA-teknikk som beskrevet i britisk patentsøknad GB 2.119.804 A, publisert 23. november 1983, har frembrakt stor interesse, både klinisk og kommersielt. Omdannelsen av det forholdsvis inaktive molekyll til et svært effektivt trombolyttisk middel ved hjelp av fibrin selv, antyder at t-PA kan foreligge som et aktivt enzym bare når den er lokalisert til selve fibrin/blodplate-tromben. t-PA anses således for å være et mye mer spesifikt trombolyttisk middel enn plasminogenaktivator av urokinasetype og streptokinase.

Reaksjonene mellom t-PA og fibrin har frembrakt det argument at naturlige inhibitorer for t-PA ikke er nødvendig for å regulere dette system; dvs. regulering oppnås gjennom dannelsen/oppløsningen av fibrin, og foreligger således ikke. Det er klart at eksistensen av slike inhibitorer i menneskeblod ville komplisere forsøk på å utforme et spesifikt, effektivt og sikkert trombolyttisk program basert på naturlig og genetisk konstruert t-PA. I det minste ville slike beregninger som med hensyn til dose, behandlingstid og virkningsfullhet av behandling, være vanskelig å forutsi og/eller overvåke. Dette problem ville være spesielt akutt dersom inhibitornivåer varierte fra individ til individ.

Eksistensen av bestemte inhibitorer for t-PA i plasma er gjenstand for en viss diskusjon, Collen, Thromb. Haemostas., 43, 77 (1980). Faktisk er det blitt rapportert, Korninger et al., Thromb. Haemostas., 46, 662 (1981), at aktiviteten av t-PA tilsatt til plasma hadde en in vitro

halveringstid på 90 minutter sammenlignet med en in vivo halveringstid på 2 minutter, Korninger et al., *Thromb. Haemostas*, 46, 658 (1981). Basert på disse observasjoner konkluderte disse forfatterne med at t-PA-inhibering ved
5 hjelp av plasma var fysiologisk uviktig.

Denne konklusjon er nylig blitt dratt i tvil i Kruithof et al., *Prog. in Fibrinolysis*, 6, 362 (1983). I Chmielewska et al., *Thromb. Res.*, 31, 427 (1983), ble
10 direkte bevis nylig rapportert for eksistensen av en hurtig inhibitor for t-PA i plasma. I alle tilfeller ble denne anti-t-PA-aktivitet påvist i plasmaet hos pasienter med eller med risiko for å utvikle tromboseproblemer; dvs. de samme individer som mest sannsynlig ville mottatt t-PA-terapi. Disse funn kan forklare det manglende hell til Korninger et
15 al., *Thromb. Haemostas.*, 46, 662 (1981), når det gjelder å påvise en slik aktivitet, ettersom de bare undersøkte plasmaet til "normale" individer. Disse rapportene vedrørende t-PA-inhibitorer utgjør litt mer enn kvalitativ beskrivelse av en "aktivitet" påvist i blodet hos noen individer.

Nylig ble det påvist et antifibrinolyttisk middel i dyrkede bovine endotelceller, Loskutoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 80, 2956 (1983). Denne inhibitor er et hovedprodukt fra endotelceller og er en inhibitor for plasminogenaktivator ettersom den kan nøytralisere aktiviteten
25 til både fibrin-uavhengige (urokinasetype) og fibrin-avhengige (vevtype) plasminogenaktivatorer (PA-er). Den iakttagelse at menneskeblodplater inneholder en immunologisk lignende inhibitor, Erickson et al., *Haemostasis*, 14 (1), 65 (1984) og *J. Clin. Invest.* 74, 1465 (1984), som
30 frigjøres fra disse som respons på fysiologisk relevante stimuli, f.eks. trombin, og parallelt med andre blodplateproteiner, f.eks. blodplatefaktor 4, understreker den potensielle viktighet av denne inhibitor i menneskebiologi. Antiserum mot plasminogenaktivatorinhibitoren (PAI) fra
35 bovine aorta-endotelceller (BAE-er) er blitt anvendt for å vise at den humane endotel-PAI samt den fra plasma, serum

og blodplater, er beslektet, dvs. immunologisk lik.
Erickson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8710
(1985).

5 Inhibitoren funnet av Loskutoff et al., Proc. Natl.
Acad. Sci. (USA), 80, 2956 (1983), ble renset fra medier
kondisjonert med bovine aorta-endotelceller ved en kombina-
sjon av concanavalin A affinitetskromatografi og preparativ
natriumdodecylsulfat-polyacrylamidgelelektroforese (SDS-
10 PAGE), og ble påvist å være et enkjedet glycoprotein med
en molekylvekt på 50.000 dalton, som hadde et isoelektrisk
punkt på 4,5-5 [van Mourik et al., J. Biol. Chem. 259,
14914 (1984)].

 Nyere bevismateriale indikerer at det finnes tre
immunologisk distinkte plasminogenaktivatorinhibitorer
15 (PAI-er). Den første er den ovenfor omtalte som primært ut-
vinnes fra endotelceller. Den andre, rapportert av Astedt
et al., Thromb. Haemostasis, 53, 122 (1985), ble isolert fra
morkake. Den tredje, rapportert av Scott et al., J. Biol.
Chem., 260, 7029 (1985), er protease-nexin.

20 Endotelcelletype-PAI adskiller seg, i tillegg til
immunologisk, fra morkake-PAI og protease-nexin ved at den
inhiberer både enkjedet og tokjedet vevtype-plasminogen-
aktivator (t-PA) samt urokinasetype-plasminogenaktivator
(u-PA), mens protease-nexin og morkake-PAI utviser praktisk
25 talt t-PA-inhibering ved fysiologiske konsentrasjoner. De
to sistnevnte inhibitorer inhiberer u-PA-aktivitet ved
fysiologiske konsentrasjoner. Videre utviser endotel-PAI
beta-mobilitet når den analyseres ved hjelp av agarose-
soneelektroforese, mens de to andre PAI-er ikke gjør det.
30 I tillegg er endotelcelle-PAI stabil overfor lave PH-verdier
(f.eks. pH 3) og SDS (0,1%), mens de to andre inhibitorene
inaktiveres hurtig med begge disse behandlingene. [van
Mourik et al., J. Biol. Chem., 259, 14914 (1984)].

35 Resultatene omtalt nedenunder, illustrerer at
endotelcelletype-PAI som utviser beta-mobilitet, også er
til stede i menneske-morkakeekstrakter, noe som også gjelder
for den morkake-PAI som er rapportert av Astedt et al.,

Thromb. Haemostasis, 53, 122 (1985). Ettersom to typer PAI lar seg oppnå fra morkake, vil den menneske-PAI som tidligere er henvist til å være av endotelcelleopprikkelse, vanligvis bli henvist til som beta-PAI eller endotel-PAI, eller endotelcelletype-PAI, mens den PAI som først ble isolert fra morkake, henvises til som morkaketype-PAI eller morkake-PAI.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse omhandler en hovedsakelig ren, rekombinant humanendotelplasminogenaktivatorinhibitor, PAI-1, kjennetegnet ved at den inhiberer aktivitetene til både t-PA og u-PA, er immunologisk forskjellig fra proteasenexin og morkakeplasminogenaktivatorinhibitor, og inneholder aminosyresekvensen som tilsvarende aminosyrene 1-379 angitt i figur 22, eventuelt fusjonert til β -galaktosidase.

Oppfinnelsen omhandler videre et biologisk rent DNA-molekyl som koder for endotelplasminogenaktivatorinhibitoren PAI-1, kjennetegnet ved at det inneholder 1140 til 3000 nucleotider og omfatter en nucleotidsekvens som består hovedsakelig av den nucleotidsekvens som, fra venstre mot høyre og i retningen fra 5'-enden til 3'-enden, svarer til sekvensen som har formelen i figur 22 fra nucleotidposisjon 13 til posisjon 1153.

Oppfinnelsen omhandler også en ikke-kromosomal ekspresjonsvektor som koder for og kan uttrykke et PAI-1-gen, kjennetegnet ved at vektoren inneholder et egnet replikasjonsorigo, en seleksjonsmarkørkodende sekvens og DNA-sekvensen ifølge kravene 4-6 i kombinasjon med transkripsjons- og translasjonsregulerende sekvenser som muliggjør ekspresjon i en egnet vertscelle.

Kort beskrivelse av tegningene

I tegningene som utgjør en del av åpenbaringen av oppfinnelsen:

5 er figur 1 en kurve som illustrerer fraksjoneringen av kondisjonerte media (CM) ved affinitetskromatografi på concanavalin A-"Sepharose". En liter CM fra sammenflytende, bovine aorta-endotelceller (BAE-er) ble sendt over en 10 milliliter (ml) concanavalin A-"Sepharose"-kolonne som beskrevet nærmere nedenunder. Kolonnen ble vasket sekvensvis med (a) 1 molar (M) NaCl, (b) 0,001M natriumfosfat, (c) 0,01M natriumfosfat inneholdende 0,5M alfa-methyl-D-mannosid og (d) 0,01M natriumfosfat inneholdende 0,5M alfa-methyl-D-mannosid og 1M NaCl. Det innfelte bilde viser proteinprofilen til utgangsmaterialet (CM), samt de sammen-
15 slåtte gjennomløpende (I), alfa-methylmannosid-fattige (II) og -rike (III) saltfraksjoner, alle avdekket etter natriumdodecylsulfat-polyacrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE) og farging med Coomassie Brilliant Blue.

20 Figur 2 er en kurve som illustrerer påvisningen av inhibitoraktivitet av concanavalin A fraksjon II (ovenfor) etter SDS-PAGE. Materialet fra concanavalin A topp II (figur 1) ble slått sammen og fraksjonert ved hjelp av SDS-PAGE i en rørgel som beskrevet nærmere nedenunder. Gelen ble skåret i skiver, idet hver skive ble eluert i buffer, og deretter ble eluatet testet med hensyn på evne til å
25 inhibere u-PA-formidlet fibrinolyttisk aktivitet som målt ved hjelp av ^{125}I -fibrin-platemetoden (beskrevet nedenunder). Det innfelte bilde viser proteinprofilen (felt 1) og inhibitoraktiviteten (felt 2) til like prøver fraksjonert ved hjelp av SDS-PAGE på plategeler og analysert hhv.
30 ved hjelp av farging med Coomassie Brilliant Blue og ved hjelp av omvendt fibrinautografi.

Figur 3 er en fotokopi av et omvendt fibrinauto-
35 gram som viser en analyse av rensset inhibitor ved hjelp av SDS-PAGE. Gelekstraktene som inneholder mesteparten av inhibitoraktiviteten (fraksjonene 49-52 som vist i figur 2), ble slått sammen og analysert på en 7,5-20% gradient plategel

som beskrevet nærmere nedenunder. Etter elektroforese ble gelen farget med Coomassie Brilliant Blue (felt 1) og perjodsyre-Schiff-reagens (felt 2), eller testet med hensyn på inhibitoraktivitet ved omvendt fibrinautografi (felt 3).

Figur 4 er en kurve som illustrerer inhiberingen av PA-aktivitet ved hjelp av BAE-inhibitoren. Økende mengder av den rensede inhibitor ble forinkubert i 5 minutter ved 37°C med 2,5 enheter/ml av enten human u-PA (O) eller t-PA (●). ¹²⁵I-plasminogen ble tilsatt, og inkuberingen fortsatte i ytterligere 60 minutter. Reaksjonen ble stanset ved oppvarming av prøvene ved 100°C i 3 minutter i nærvær av 3% SDS og 5% 2-mercaptoethanol. De forskjellige prøvenes evne til å spalte ¹²⁵I-plasminogenet i dets karakteristiske tunge og lette kjeder, ble fastslått ved hjelp av SDS-PAGE og autoradiografi som i Mussoni et al., Thromb. Res., 34, 241 (1984). Kvantifisering ble oppnådd ved å skjære ut det ¹²⁵I-merkede plasminogen og plasminkjedene fra den tørkede gel, og telle dem i en gammateller. Dataene er uttrykt som en prosentandel av plasminogenspalting iaktatt i fravær av inhibitor.

Figur 5 er en fotokopi av et autoradiogram som viser bindingen av ¹²⁵I-merket t-PA til BAE-inhibitoren. ¹²⁵I-merket t-PA ble inkubert i 30 minutter ved 37°C i fravær (felt 1) eller nærvær (felt 2) av den rensede inhibitor (1 mikrogram/ml). Reaksjonen ble stanset ved tilsetning av prøvebuffer, og prøvene ble så analysert ved hjelp av SDS-PAGE og autoradiografi.

Figur 6 er en kurve som illustrerer de relative stabiliteter til BAE-inhibitoren og protease-nexin. Renset inhibitor (20 mikrogram/ml) og renset protease-nexin (160 mikrogram/ml) ble inkubert i 60 minutter ved 37°C ved pH 2,7 (A) eller i nærvær av 0,025% SDS (B) som beskrevet nærmere nedenunder. Prøvene ble nøytralisert ved tilsetning av tre volumdeler prøvebuffer, fortynnet i prøvebuffer, og testet med hensyn på gjenværende inhibitoraktivitet ved hjelp av ¹²⁵I-fibrinplateprøven (beskrevet nedenunder). I kontrollforsøk ble PBS erstattet med hhv.

glycin og SDS. Dataene er uttrykt som den prosentandel av u-PA-kontroller som mangler inhibitor. Prøvene testet omfattet ubehandlet (O) og behandlet (●) protease-nexin, og ubehandlet (Δ) og behandlet (▲) BAE-inhibitor.

Figur 7 er en kurve som illustrerer SDS-PAGE for L[3,4,5-³H]-leucin-merket concanavalin A fraksjon II. En aliquot (225 mikroliter) av prøven fra concanavalin A topp II ble underkastet SDS-PAGE i rørgeler. Etter elektroforese ble gelen skåret i skiver, og hver av skivene ble ekstrahert i buffer som beskrevet nærmere nedenunder. De resulterende gelekstrakter ble testet med hensyn på inhibitoraktivitet ved hjelp av ¹²⁵I-fibrin-platemetoden (●) og med hensyn på radioaktivitet ved hjelp av scintillasjonstelling (O) som beskrevet nedenunder.

Figur 8 er en kurve som illustrerer alkalisk PAGE av L[3,4,5-³H]-leucin-merket inhibitor ekstrahert fra SDS-geler. Inhibitorfraksjonene etter SDS-PAGE (skive-ekstrakter 51-54, som vist i figur 7) ble slått sammen, blandet med albumin til en sluttkonsentrasjon på 100 mikrogram/ml og dialysert mot PBS inneholdende 0,5% "Triton" X-100. Prøven ble så fraksjonert ved hjelp av alkalisk PAGE i rørgeler og bearbeidet for bestemmelse av radioaktivitet (O) og inhibitoraktivitet (●) som beskrevet ovenfor for figur 7.

Figur 9 er en fotokopi av et autoradiogram som viser immunutfelling av inhibitor fra CM. L[3,4,5-³H]-leucin-merket CM fra klonede BAE-er ble inkubert med protein A-"Sepharose"-kuler inneholdende antiserum mot rensert inhibitor som beskrevet nærmere nedenunder. De immobiliserte komplekser ble ekstrahert fra kulene ved inkubering i 1 time ved 37°C med 0,25M Tris, 2,2% SDS, 2,5% (volum/volum) 2-mercaptoethanol og 20% glycerol (pH 6,5). Ekstraktene ble fraksjonert ved hjelp av SDS-PAGE på plategeler og undersøkt ved autoradiografi. Felt 1 viser utgangsmateriale (CM); felt 2 viser immunosupernatant; felt 3 viser immunopresipitat. Pilen indikerer stillingen til inhibitoraktivitet slik den ble avslørt ved hjelp av omvendt fibrinautografi.

Figur 10 er en grafisk fremstilling som viser bindingen av rensset inhibitor til mikrotiterbrønner belagt med varierende konsentrasjoner av t-PA. Polyvinylklorid (PVC) plastbrønner ble inkubert i ca. 18 timer ved 4°C med t-PA i fosfatbufret saltoppløsning (PBS) (50 mikroliter/brønn) ved de angitte konsentrasjoner i mikrogram/milliliter (µg/ml) enheter. Brønnene ble skylt, blokkert med bovint serumalbumin (BSA) og inkubert i 2 timer med rensset inhibitor i fortynningsbuffer: 20 nanogram (ng)/ml, ●-----●; 50 ng/ml, ○-----○; 100 ng/ml, Δ-----Δ. Etter vasking av brønnene ble den bundne inhibitor påvist ved inkubasjon i 2 timer ved 37°C med kanin-anti-inhibitor-reseptor (1:100 fortynning), etterfulgt av en 2 timers inkubasjon ved 37°C med ¹²⁵I-geit-anti-kanin IgG (1,5x10⁵ cpm/brønn). Den bundne radioaktivitet i hver av de enkelte brønner ble bestemt i en gammateller og er vist som prosentandel av den som ble frembudt for binding.

Figur 11 er en kurve som illustrerer kinetikken til inhibitor som binder seg til t-PA-belagte brønner. PVC-plastbrønner ble inkubert over natten ved 4°C med 50 mikroliter av enten t-PA (1 ng/ml i PBS, ●-----●) eller BSA (1 ng/ml i PBS, ○-----○). Brønnene ble skylt, blokkert med BSA og inkubert ved 37°C i de angitte tidsrom med rensset inhibitor (100 ng/ml) i fortynningsbuffer. Etter skylling av brønnene ble den bundne inhibitor påvist som angitt for figur 10.

Figur 12 er en kurve som illustrerer virkningen av inkubasjonstid på enten første eller andre antistoff på påvisningen av rensset inhibitor. PVC-plastbrønner ble belagt med t-PA (lukkede figurer) eller BSA (åpne figurer), skylt, blokkert og inkubert i 1 time med den rensede inhibitor (50 ng/ml) som beskrevet i figur 10. Brønnene ble inkubert med kanin-anti-inhibitor-reseptor (Rb α In) (1:100 fortynning, ○, ●) i de angitte tider etterfulgt av en 2 timers inkubasjon med ¹²⁵I-geit-anti-kanin-IgG (¹²⁵Gt α Rb IgG) (1,5x10⁵ cpm/brønn). Alternativt ble brønnene inkubert i 2 timer med kanin-anti-inhibitor-

reseptor, og inkubasjonstiden på ^{125}I -geit-anti-kanin-IgG (Δ , $\blacktriangle$) ble variert.

Figur 13 er en kurve som illustrerer virkningen av varierende mengder av kanin-anti-inhibitor-reseptor på påvisningen av rensset inhibitor. PVC plastbrønner ble belagt med t-PA, skylt, blokkert og inkubert med inhibitoren (50 ng/ml) i de mengder som er vist som beskrevet for figur 10.

Brønnene ble så inkubert i 2 timer ved 37°C med kanin-anti-inhibitor-reseptor ved forskjellige fortynninger (1:50, $\bullet$; 1:75, Δ ; 1:100, $\blacksquare$; 1:200, $\square$; 1:500, $\circ$). Det bundne antistoff-inhibitor-t-PA-kompleks ble påvist som beskrevet for figur 10.

Figur 14 er en kurve som illustrerer virkningen av varierende mengder av ^{125}I -geit-anti-kanin-IgG på påvisningen av rensset inhibitor. PVC plastbrønner ble belagt med t-PA, skylt, blokkert og inkubert med inhibitoren (50 ng/ml) som beskrevet for figur 10. Brønnene ble inkubert i 2 timer ved 37°C med kanin-anti-inhibitor-reseptoren (1:75). Etter skylling ble brønnene inkubert i 2 timer ved 37°C med $2,5 \times 10^4$ (Δ), 5×10^4 ($\circ$), 1×10^5 ($\square$), $1,5 \times 10^5$ ($\blacksquare$), 2×10^5 ($\blacktriangle$), 3×10^5 ($\bullet$) cpm av ^{125}I -geit-anti-kanin-IgG.

Figur 15 er en kurve som illustrerer den doseresponskurve for påvisning av rensset inhibitor og inhibitor som er til stede i BAE-kondisjonerte medier, idet bindingsprøven for inhibitor under de spesielt foretrukne betingelser fastslått gjennom figurene 10-14, anvendes. t-PA-belagte brønner ble inkubert i 1 time ved 37°C med de angitte konsentrasjoner av enten rensset inhibitor ($\bullet$) eller sekvensvise fortynninger av bovine aorta-endotelcelle (BAE)-kondisjonerte medier ($\circ$). Den bundne inhibitor ble kvantifisert med kanin-anti-inhibitor-reseptor (1:75) etterfulgt av ^{125}I -geit-anti-kanin-IgG ($2,5 \times 10^4$ cpm) som beskrevet for figur 10.

Figur 16 er en kurve som illustrerer standarddose-responskurven for rensset inhibitor ifølge figur 15, fremstilt som en log- versus log-plot. Bindingsdataene for den rensede inhibitor vist i figur 15, ble brukt.

Figur 17 er en kopi av et autogram som viser dose-responskurven for inhibitor slik den ble påvist ved hjelp av omvendt fibrinautografi. Forskjellige konsentrasjoner av rensset inhibitor ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE og omvendt fibrinautografi, slik som beskrevet nærmere neden-
5 under. Felt 1; 0,5 ng, felt 2: 1 ng, felt 3; 2,5 ng, felt 4; 5 ng, felt 5; 10 ng. Molekylvekt-markører er angitt.

Figur 18 er en kurve som illustrerer virkningen av eksogen PA på bindingen av inhibitor til immobilisert t-PA. Renset inhibitor (50 ng/ml) ble inkubert i 1 time ved 37°C med de angitte konsentrasjoner av t-PA (●), u-PA (UK, ▲) eller streptokinase (SK, ■). Bindingen av inhibitor til t-PA ble kvantifisert i bindingsanalysen for inhibitor be-
10 skrevet nærmere nedenunder.

Figur 19 er en kurve som illustrerer inhibitor-aktiviteten i ng/ml av normal menneskeplasma og -serum. Blodprøver samlet opp ved venepunktur fra friske donorer, ble plassert i "syre-citrert" dextrose (ACD). Plasma og serum ble fremstilt fra hver blodprøve, og inhibitoraktiviteten
15 ble målt i bindingsprøven for inhibitor beskrevet nærmere nedenunder.

Figur 20 er et fotografi av en "Western blot"-analyse av E. coli råekstrakter. Ekstrakter fremstilt fra induserte, lysogene E. coli-stammer, ble fraksjonert ved hjelp av SDS-PAGE og analysert ved hjelp av "Western blotting" som be-
25 skrevet nedenunder. Feltene A, D og F inneholder 300 nanogram (ng) rensset bovin aorta-endotelcelle (BAE) beta-PAI. Feltene B og E inneholder 50 mikroliter (µl) av ekstrakt fra E. coli-stamme Y1089 lysogenisert med λ9.2, en rekombinant lambda-fag med PAI-cDNA-sekvensen av human endotelcelletype innført. Felt C inneholder 50 µl ekstrakt fra stamme Y1089
30 lysogenisert med vektoren λgt₁₁ som mangler innskuddet. For "Western blotting"-forsøkene vist i feltene A-C, ble affinitetsrenset IgG mot BAE beta-PAI brukt som primært antistoff. For "Western blotting" av feltene D-F var det
35 anvendte antiserum affinitetsrenset på forskjellige proteiner bundet til nitrocellulosepapir. For felt D ble det brukt

antiserum affinitetsrenset på fusjonspolypeptidet fra λ 9,2, for felt T antiserum affinitetsrenset på BAE beta-PAI, og for felt F antiserum affinitetsrenset på proteiner med M_r 150-200 kilodalton (kda) fra λ gt₁₁-lysogenet. Autoradiogrammene ble eksponert i 16 timer.

Figur 21 er et fotografi som viser analysen av inhibitoraktivitet i ekstrakter fra induserte E. coli-lysogener. Ekstrakter fra lysogene E. coli-stammer ble fraksjonert ved hjelp av SDS-PAGE og deretter analysert ved omvendt fibrin-autografi (RFA) under anvendelse av u-PA (feltene A-C) og "Western blotting" etterfulgt av autoradiografi (feltene D-F). Feltene A og D inneholder 300 ng renset bovin beta-PAI. Feltene B og E inneholder 50 μ l ekstrakt fra stammen som er lysogen for λ 9,2. Feltene C og F inneholder 50 μ l ekstrakt fra stammen som er lysogen for λ gt₁₁. Autoradiogrammet for felt D ble eksponert i 16 timer, mens autoradiogrammene for feltene E og F ble eksponert i 2 uker.

Figur 22 illustrerer den fullstendige nucleotidsekvens til cDNA-innskuddet i λ 3. Nucleotidsekvensen til den kodende molekyltråd og den tilsvarende forutsagte aminosyresekvens er vist. Tallene i venstre marg henviser til nucleotidenes posisjoner, og tallene til høyre henviser til aminosyrerestenes posisjoner. Valinet betegnet som nummer 1, er aminoenden i det utkodede beta-PAI-protein, og aminosyre-restsekvensen som svarer til det fullt utviklede protein, er nummerert 1-379. Aminosyrerestsekvensen som svarer til en del av signalpeptidet, er representert ved hjelp av minus-tallene i den motsatte retning.

Figur 23 er et fotografi av et autoradiografi som illustrerer påvisning av beta-PAI-mRNA. Total RNA fra fibrosarcom-cellelinjen HT 1080 ble isolert, underkastet agarosegelelektroforese i nærvær av formaldehyd og ble etter "blotting" til nitrocellulose hybridisert til 32 P-merket λ 3-cDNA. Som markører på venstre side ble det brukt Hind III-oppløst λ -DNA. De relative mobiliteter til den eukaryote 28S og 18S ribosomale RNA er angitt.

Figur 24 gir deler av utledede aminosyrerest-sekvenser for sammenligning mellom beta-PAI, alfa-anti-trypsin (alfa₁AT) og antitrombin III (AT III). Sekvensene til beta-PAI, alfa₁AT og AT III rundt de reaktive sentrene ble stilt opp i henhold til "Fast Protein Homology Program" [Lipman et al. (1985) Science, 227, 1435-1441], idet en-bokstavs-betegnelsene for aminosyrerester ble brukt. Binding ved peptidenes reaktive sete er angitt ved hjelp av den vertikale linje, og terminologien for P₁-P₁'-restene i det reaktive sete er tatt fra Travis og Salvesen, (1983) Ann. Rev. Biochem. 52, 655-709. Methioninene i det reaktive sete er understreket, og aminosyrerestene i alfa₁-AT og AT III som er homologe med de i beta-PAI, er innrammet.

Nærmere beskrivelse av oppfinnelsen

Definisjoner

Uttrykket "plasminogenaktivatorinhibitor" (PAI) er, slik det her er brukt, ment å angi et protein som inhiberer eller kontrollerer virkningen av en plasminogenaktivator. PAI som her er anvendbar, kan være fra en rekke kilder, slik som bovine aorta-endotelceller (BAE-er), humane kilder slik som endotelceller, morkakeekstrakter, blodplater, plasma og serum, og en transformert eller neoplastisk cellelinje (f.eks. HG 1080), eller det proteinlignende molekyl som fremstilles ved rekombinante teknikker, slik som et fusjons-polypeptid som her beskrevet. Den PAI som anvendes, binder seg til og inhiberer aktiviteten til plasminogenaktivator av vevstype, og følgelig er den endotel- eller beta-PAI som her er beskrevet, den PAI som er av interesse og valg sammenlignet med den såkalte morkake-PAI eller protease-nexin som primært inhiberer u-PA. Den anvendbare inhibitor binder seg imidlertid til og inhiberer både t-PA og u-PA, slik det også er omtalt her.

"Plasminogenaktivator" er et protein som aktiverer plasminogen, særlig i plasma, og omdanner det til plasmin i det fibrinolyttiske system i blod, celler, vev og kroppsvæsker. Plasminogenaktivatorer som kan anvendes i foreliggende oppfinnelse, omfatter plasminogenaktivator av vevstype

- (t-PA) og plasminogenaktivator av urokinasetype (u-PA). Slik det her er brukt, er "urokinasetype" ment å angi urokinase og dens homologe proteiner slik de finnes i andre pattedyr enn mennesker.

5 Uttrykket "immunologisk forskjellig" er her brukt i den betydning at antistoffer fremkalt mot et molekyl, ikke reagerer immunologisk (kryssreagerer) med et annet molekyl. F.eks. kryssreagerer ikke antistoffer fremkalt mot det rekombinante, proteinlignende molekyl som er omtalt neden-

10 under, hverken med protease-nexin eller morkake-plasminogen-aktivatorinhibitor.

 Omvendt er uttrykket "immunologisk lik" her brukt til å beskrive et molekyl som er i stand til å indusere utskillelsen av antistoffer som kryssreagerer med et annet molekyl,

15 og følgelig er de to molekylerne immunologisk like. F.eks. kryssreagerer antistoffer fremkalt mot det rekombinante, proteinlignende molekyl som er omtalt nedenunder, med humane og bovine plasminogenaktivatorinhibitorer av endotelcelle-

20 type, og følgelig er de tre molekylerne immunologisk like.

 Uttrykket "proteinlignende molekyl" benyttes her til å betegne et forholdsvis stort polypeptid som har en relativ tilsynelatende molekulmasse på minst ca. 40.000 dalton. Uttrykket er ment å omfatte både det rekombinante molekyl som er omtalt nedenunder, som en fusjon mellom en del

25 av et beta-galactosidaseprotein utvunnet fra en vektor, og også molekylet som er translatert fra en betegnet genom-sekvens, slik som en sekvens ifølge figur 22.

 Uttrykket "bindingsreagens" brukes her i betydningen av et biologisk aktivt molekyl som binder seg til eller

30 danner kompleks med et annet molekyl. Et bindingsreagens kan derfor være en reseptor, og dens ligand, slik som et antistoff eller antigen som reagerer immunologisk med hhv. sin ligand (antigen) eller reseptor (antistoff). Beta-PAI sammen med t-PA eller u-PA utgjør også bindingsreagenser for

35 hverandre, noe som også gjelder for protein A fra *S. aureus* Cowan-stamme og en antistoff-Fc-del. Spesifikke bindingsreagenser og restene som de binder seg til, er eksempli-

·
fisert ytterligere nedenunder. Reseptorer benyttes imidlertid i dette avsnitt for å eksemplifisere mesteparten av de definerte uttrykk som vedrører bindingsreagenser.

5 Uttrykket "reseptor" er slik det her er brukt, ment å angi et biologisk aktivt molekyl som binder seg til en antigenligand. Et reseptormolekyl eller en reseptor ifølge foreliggende oppfinnelse er et antistoff, et i det vesentlige intakt antistoff i hovedsakelig rensert form, slik som det finnes i ascites-væske eller serum fra et immunisert dyr, eller
10 en idiotype-holdig polypeptiddel av et antistoff, slik som Fab- og $F(ab')_2$ -antistoffdeler som er beskrevet nedenunder.

 Biologisk aktivitet til et reseptormolekyl eller annet bindingsreagens bevises ved bindingen av reseptoren til dens antigene ligand etter blandingen av disse i et
15 vandig medium og oppbevaring under biologiske analysebetingelser i et forutbestemt tidsrom i minutter til timer, slik som ca. 10 minutter til ca. 16-20 timer, som er tilstrekkelig til å danne en immunoreaktant (et kompleks).

 Biologiske analysebetingelser er de som opprettholder
20 den biologiske aktivitet i liganden og reseptormolekylene, eller andre bindings- og bundne enheter. Slike analysebetingelser omfatter et temperaturområde fra ca. 4°C til ca. 45°C, og fysiologiske pH-verdier og ionestyrker. Reseptorene og andre bindingsreagenser binder seg også til
25 det antigene ligand innenfor et pH-verdiområde fra ca. 5 til ca. 9, og ved slike ionestyrker som fra ionestyrken i destillert vann til ionestyrken i ca. 1 molar natriumklorid. Metoder for optimalisering av slike betingelser er godt kjent innen teknikken.

30 Idiotype-holdige polypeptiddeler (antistoff-bindings-seter) i antistoffer er de deler av antistoffmolekyler som omfatter idiotypen og binder seg til liganden, og omfatter Fab-, Fab'- og $F(ab')_2$ -delene i antistoffene. Fab- og $F(ab')_2$ -delene i antistoffer er godt kjent innen teknikken
35 og fremstilles ved hjelp av reaksjonen til hhv. papain og pepsin på i det vesentlige intakte antistoffer ved hjelp av fremgangsmåter som er godt kjente. Se f.eks. U.S. patent-

skrift nr. 4.342.566. Fab'-deler av antistoffer er også godt kjente og fremstilles ved reduksjon av $F(ab')_2$ -disulfidbindinger som ved hjelp av mercaptoethanol, etterfulgt
5 av alkylering av de således fremstilte, reduserte cysteinerester med et reagens, slik som jodacetamid. Intakte antistoffer er foretrukne reseptorer og benyttes som illustrerende for reseptormolekylene ifølge oppfinnelsen.

Antistoffer og reseptormolekyler omtales her som
10 "fremkalt" mot et bestemt immunogen. Selv om idiotypeholdige antistoffdeler er produkter av menneskets påvirkning på antistoffer, og følgelig ikke er "fremkalt" som sådanne, brukes uttrykket "fremkalt" sammen med slike reseptorer for lettere å kunne uttrykke seg.

15 Reseptorene som benyttes som illustrerende i foreliggende oppfinnelse, er polyklonale reseptorer. En "polyklonal reseptor" (Pab) er en reseptor fremstilt ved hjelp av kloner av forskjellige antistoffproduserende (-utskillende) celler som produserer (utskiller) antistoffer mot en
20 rekke epitoper av det immuniserende molekul. Monoklonale reseptorer som utskilles av kloner av en hybridomcelle som bare utskiller ett slag antistoffmolekul, er også omfattet. Hybridomcellen smeltes sammen fra en antistoffproduserende (utskillende) celle og et myelom eller annen selv-forevigende
25 cellelinje. Slike reseptorer som hele antistoffer ble først beskrevet av Kohler og Milstein, Nature, 256, 495-497 (1975).

Ikke-humane, varmblodige dyr som kan brukes i forbindelse med foreliggende oppfinnelse som verter hvori de
30 polyklonale reseptorerene fremkalles, kan omfatte fjærkre (slik som en kylling eller en due), et medlem av strutsefuglgruppen (slik som en emu, struts, kasuar eller moa), eller et pattedyr (slik som en hund, katt, apekatt, geit, gris, ku, hest, kanin, marsvin, rotte, hamster eller mus). Vertsdyret er
35 fortrinnsvis en kanin.

Reseptorer og andre bindingsreagenser benyttes sammen med et indikator-merkemiddel eller "indikerende gruppe" eller en "markør". Den indikerende gruppe eller markør benyttes

sammen med reseptoren som et middel for å signalisere (bestemme) at en bestemt inhibitor har bundet seg til reseptoren.

Uttrykkene "indikator-merkingsmiddel", "indikerende gruppe" eller "markør" er her ment å omfatte enkle atomer og molekyler som er bundet til reseptoren eller brukt separat, og uansett om disse atomene eller molekylene brukes alene eller sammen med ytterligere reagenser. Slike indikerende grupper eller markører er selv godt kjent i immunokjemi og utgjør en del av oppfinnelsen bare såfremt de benyttes sammen med ellers nye reseptorer, fremgangsmåter og/eller systemer.

Den signalgivende markør som benyttes, er vanligvis bundet til et annet molekyl eller del av et molekyl, slik som omtalt nedenunder. Som sådan er markøren operasjonelt bundet til det andre molekyl eller en slik molekyl som en reseptor slik at bindingen av molekylet som markøren er bundet til, ikke i vesentlig grad skades av markøren, og den ønskede signalisering tilveiebrakt ved hjelp av markøren, skades ikke vesentlig.

Indikator-merkingsmidlet kan være et reaktivt fluorescerende merkingsmiddel som binder seg kjemisk til antistoffer eller antigener uten å denaturere dem slik at det dannes et fluorokrom (fargestoff) som er en nyttig immunofluorescerende tracer. Egnede reaktive, fluorescerende merkingsmidler er fluorokromer, slik som fluorescein-isocyanat (FIC), fluorescein-isothiocyanat (FITC), dimethyl-amino-nafthalen-S-sulfonylchlorid (DANSC), tetramethyl-rhodamin-isothiocyanat (TRITC), lissamin-rhodamin B200, sulfonylchlorid (RB 200 SC) og lignende. En beskrivelse av immunofluorescensanalyseteknikker finnes i DeLuca, "Immunofluorescence Analysis", i Antibody As A Tool, Marchalonis et al. red., John Wiley & Sons Ltd., s. 189-231 (1982).

Indikator-merkingsmidlet kan være bundet direkte til en reseptor ifølge oppfinnelsen, til et anvendbart antigen eller bindingsreagens, slik som t-PA eller u-PA, eller kan

omfatte et separat molekyl. Det er særlig foretrukket at indikatoremidlet er et separat molekyl, slik som antistoffer som binder seg til en reseptor ifølge oppfinnelsen. Protein A fra *Staphylococcus aureus* Cowan-stamme, her av og til
5 henvist til som protein A, kan også anvendes som en separat molekyl-indikator eller merkingsmiddel hvor en intakt eller i det vesentlige intakt antistoffreseptor ifølge oppfinnelsen benyttes. I slike anvendelser inneholder protein A selv en markør, slik som et radioaktivt grunnstoff eller et
10 fluorokrom-fargestoff, slik det er omtalt nedenunder.

Den indikerende gruppe kan også være et biologisk aktivt enzym, slik som pepperrotperoxydase (HRP) eller glucoseoxydase, eller lignende. Når hoved-indikatorgruppen er et enzym, slik som HRP eller glucoseoxydase, er det på-
15 krevet med ytterligere reagenser for å visualisere det faktum at et reseptor/ligand-kompleks er blitt dannet. Slike ytterligere reagenser for HRP omfatter hydrogenperoxyd og en oxydasjonsfargestoff-forløper, slik som diaminobenzidin. Et ytterligere reagens som kan benyttes sammen med glucose-
20 oxydase, er 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS).

Radioaktive grunnstoffer utgjør en annen markørklasse og brukes her som eksempel på anvendbare markører. Et eksempelvis radiomerkingsmiddel som kan benyttes i oppfinnelsen,
25 er et radioaktivt grunnstoff som gir gammastråleemisjoner. Grunnstoffer som selv sender ut gammastråler, slik som ^{124}I , ^{125}I , ^{128}I , ^{131}I , ^{132}I og ^{51}Cr , utgjør en klasse av gammastråleemisjons-produserende, indikerende grupper av radioaktive grunnstoffer. Særlig foretrukket er ^{125}I . En annen
30 klasse av anvendbare indikerende grupper er de grunnstoffene, slik som ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O og ^{13}N som selv sender ut positroner. De således emitterte positroner produserer gammastråler etter å ha støtt på elektroner som er til stede i analysemediet. Anvendbar er også en betastråleutsender, slik som ^{111}In .
35

Radioaktive, monoklonale reseptorer kan lages ved å dyrke et passende hybridom i et medium som inneholder radioaktive aminosyrer, noe som er godt kjent. Både monoklonale

og polyklonale reseptorer kan fremstilles ved å isolere reseptorene og deretter merke dem med et av de ovenfor nevnte radioaktive grunnstoffer. Radiomerking av proteiner er godt kjent innen teknikken og vil ikke bli omtalt nærmere her.

De følgende forkortelser og symboler er brukt.

bp	-	basepar
kb	-	1000 bp
kda	-	kilodalton
M_r	-	tilsynelatende relativ molekylmasse
DNA	-	deoxyribonucleinsyre
cDNA	-	komplementært DNA
RBS	-	ribosom-bindende sete
		(Shine-Dalgarno-sekvens)
RNA	-	ribonucleinsyre
replikon	-	den enhet som kontrollerer enkelt- stående handlinger ved replikasjon; det har et begynnelsepunkt hvor replika- sjon initieres, og det kan ha et avslut- ningspunkt hvor replikasjon stanser.

Uttrykket "svarer til" i dets forskjellige grammatikalske former brukes her i forbindelse med nucleotidkodonsekvenser i betydningen den beskrevne nucleotidkodonsekvens som bare inneholder konservative kodonsubstitusjoner som koder for bestemte aminosyrerester langs proteinsekvensen.

Uttrykket "konservativ kodonsubstitusjon" er, slik det er brukt ovenfor, ment å betegne at et kodon er blitt erstattet av et annet som fører til translasjon av et protein hvor aminosyreresten er blitt erstattet av en annen, biologisk lik rest. Eksempler på konservative substitusjoner på aminosyrerestnivået (translasjon eller ekspresjon) omfatter substitusjonen av en hydrofob rest, slik som Ile, Val, Leu eller Met, med en annen, eller substitusjonen av en polar rest med en annen, slik som mellom Arg og Lys, mellom Glu og Asp eller mellom Gln og Asn, og lignende.

I noen tilfeller er utbyttingen av en ionerest med en motsatt ladet ionerest, slik som Asp med Lys, blitt kalt konservativ innen teknikken på grunn av at disse ione-gruppene antas kun å gi oppløselighetshjelp. Generelt anses imidlertid utbytting av en ionerest med en annen ionerest av motsatt ladning her for å være "radikal utbytting", noe som også gjelder for utbyttinger mellom ikke-ioniske rester og ionerester, og voluminøse rester, slik som Phe, Tyr eller Trp, og mindre voluminøse rester, slik som Gly, Ile og Val.

Uttrykkene "ikke-ioniske" og "ione-" rester er her brukt i sin vanlige betydning for å betegne de aminosyrerester som hhv. normalt enten ikke bærer noen ladning eller normalt bærer en ladning, med fysiologiske pH-verdier. Eksempler på ikke-ioniske rester omfatter Thr og Gln, mens eksempler på ionerester omfatter Arg og Asp.

På nucleotidnivået er uttrykket "svarer til" også ment å betegne at det tredje nucleotid i et kodon kan byttes ut med et annet nucleotid slik at kodonet som inneholder substitusjonen, koder for de samme aminosyrerester som det ikke-substituerte kodon gjorde. Slik overflod av forskjellige kodoner som translateres til den samme aminosyrerest, er godt kjent innen teknikken.

Uttrykket "hovedsakelig ren" henviser slik det her er brukt, til et biologisk stoff som i det vesentlige er fritt for alt heterogent eller fremmed stoff.

Når de brukes i en sammenheng som beskriver eller skildrer nucleotidsekvenser, er purin- eller pyrimidin-basene som utgjør nucleotidsekvensen, avmerket på følgende måte:

- A - deoxyadenyl
- G - deoxyguanyl
- C - deoxycytosyl
- T - deoxythymidyl

Ved beskrivelse av en nucleotidsekvens representerer hver tre-bokstav-triplett utgjort av basene identifisert ovenfor, et trinucleotid av DNA (et kodon) med en 5'-ende til venstre

og en 3'-ende til høyre.

Aminosyrerestene og aminosyrerestsekvensene i proteinene som her er beskrevet, er avmerket ved hjelp av sine tre-bokstav- eller en-bokstav-symboler som er identifisert og korrelert i samsvarstabellen nedenunder:

Samsvarstabell

10 SYMBOLER FOR AMINOSYRER

	<u>Tre-bokstav</u>	<u>En-bokstav</u>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
15 Asparaginsyre	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutaminsyre	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
20 Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
25 Fenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptofan	Trp	W
30 Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Aminosyrerester i proteiner og polypeptider er i sine naturlige, L-konfigurasjoner.

I. GENERELL REDEGJØRELSE

Foreliggende oppfinnelse er rettet mot biologisk rent DNA-molekyl som koder for PAI av human endotelcelletype eller et fusjonspolypeptid som inneholder denne PAI, dvs. et proteinnliknende molekyl som er immunologisk likt med denne PAI. Dette DNA-molekyl inneholder 1140 til 3000 nucleotider eller nucleotidbasepar (bp) og omfatter en nucleotidsekvens som består hovedsakelig av den nucleotidsekvens som svarer til en nucleotidsekvens representert ved formelen i figur 22, fra venstre mot høyre og i retning fra 5'-avslutning til 3'-avslutning (5'-ende til 3'-ende). Avlesningsrammen til nucleotidsekvensen ifølge oppfinnelsen må selvfølgelig være i overensstemmelse med avlesningsrammen for PAI av human endotelcelletype eller et fusjonspolypeptid som inneholder PAI av endotelcelletype. Avlesningsrammen må således ikke endre seg, men må være den samme som den hvor nucleotidresten i posisjon 13 vist i figur 22, er den første nucleotidrest i et triplettkodon.

Et egnet DNA-molekyl omfatter en nucleotidsekvens som svarer til den viste sekvens fra nucleotidposisjon 13 til posisjon 1153. Andre egnede DNA-molekyler omfatter DNA-sekvenser som svarer til de viste sekvenser fra nucleotidposisjon 1 til nucleotidposisjon 1153, fra nucleotidposisjon 1 til nucleotidposisjon 1960, samt hele sekvensen vist i figur 22 fra nucleotidposisjon 1 til nucleotidposisjon 2995.

En nucleotidsekvens ifølge oppfinnelsen består hovedsakelig av en av de tidligere beskrevne sekvenser. En nucleotidsekvens ifølge oppfinnelsen utelukker således ytterligere nucleotider som påvirker de grunnleggende og nye karakteristika til en nucleotidsekvens som koder for human endotel-PAI.

En nucleotidsekvens ifølge oppfinnelsen kan omfatte en eller flere transkripsjonelle promotersekvenser operasjonelt bundet til sekvensen ved siden av dennes 5'-ende. Når det ønskes translasjon av DNA og proteinekspresjon, omfatter DNA også et translasjonsinitierende kodon (ATG) og et translasjonsterminerende kodon (TAA eller TAG eller TGA), som hverter operasjonelt bundet ved siden av hhv. 5'-enden og 3'-enden til sekvensen, idet det translasjonsinitierende kodon befinner seg mellom promotersekvensen og 5'-enden.

En DNA-sekvens som koder for hele eller en del av et annet molekyl, kan også være inkludert i DNA-molekylet slik at det translaterte (uttrykte), proteinlignende molekyl er et fusjonspolypeptid som omfatter en aminosyrerestsekvens av hele eller en del av det andre molekyl fusjonert (bundet ved hjelp av en peptidbinding) til den uttrykte, humane endotel-PAI. Et eksempelvis fusjonspolypeptid er det proteinlignende molekyl omtalt nedenunder, som inneholder en del av beta-galactosidasemolekylet fusjonert til aminoen i human endotelcelle-PAI. Dette molekylet omfatter også fire aminosyrerester av PAI-lederpeptidet fusjonert ved hjelp av peptidbindinger mellom beta-galactosidasedelen og PAI-sekvensen.

Alle de ovenfor nevnte nucleotidsekvenser kan være til stede så lenge som et spesifisert DNA-molekyl forblir replikerbart, når bare replikasjon er ønsket. Når replikasjon og translasjon (ekspresjon av proteinlignende molekyl) er ønsket, er disse nucleotidsekvensene til stede så lenge som DNA-molekylet forblir replikerbart og det proteinlignende molekyl som inneholder aminosyrerestsekvensen til uttrykt human endotelcelletype-PAI, utviser immunologisk kryssreaktivitet (omtalt nedenunder) med den naturlig forekommende, bovine og humane endotel-PAI som her er beskrevet. Det uttrykte proteinlignende molekyl binder seg også fortrinnsvis til t-PA og utviser inhibering av minst t-PA i en omvendt fibrinautografianalyse, slik som her omtalt. Helst binder dette uttrykte molekyl seg også til og utviser inhibering av u-PA-aktivitet i den omvendte fibrinautografianalyse.

Ettersom en nucleotidsekvens ifølge oppfinnelsen inneholder en nucleotidsekvens som svarer til en sekvens med formel vist i figur 22, omfattes konservative kodonsubstitusjoner samt konservative nucleotidsubstitusjoner, slik som disse uttrykkene er definert her.

En nucleotidsekvens ifølge oppfinnelsen kan være entrådet som vist i figur 22. Helst er imidlertid en DNA-sekvens bundet ved hjelp av hydrogenbindinger til et andre DNA-molekyl, idet det andre DNA-molekyl har en nucleotidsekvens som er komplementær og i antiparallell orientering til den førstnevnte DNA. Helst er således en DNA ifølge

30

35

oppfinnelsen dobbelttrådet og inneholder en tidligere beskrevet DNA-sekvens som svarer til hele eller en spesifisert del av sekvensen vist i figur 22 sammen med en komplementær sekvens.

5 En ikke-kromosomal vektor for oppformering og ekspresjon av en ønsket DNA-nucleotidsekvens som definert ovenfor i et replikasjons/ekspresjons-medium, f.eks. en encelleorganisme eller lignende, slik som *E. coli*, *S. cerevisiae* eller pattedyrceller, slik som COS-celler, omfattes også.
10 Denne vektoren omfatter et replikon som er forenlig med replikasjons/ekspresjons-mediet og inneholder DNA-molekylet som skal replikeres på en slik måte at vektoren kan formere DNA-molekylet.

15 I tillegg omfatter den ikke-kromosomale vektor de sekvensbestanddeler som benyttes for transkripsjon og translasjon. For dette formål kan en transkripsjonell promoter være operasjonelt bundet til DNA-molekylet som er til stede ved siden av dens 5'-ende, slik som allerede bemerket. Den transkripsjonelle promoter kan være endogen i forhold til
20 vektoren eller exogen i forhold til vektoren. En transkripsjonell promoter som er endogen i forhold til vektoren, slik som lac Z-promoter-operatoren som her benyttet, er foretrukket. En translasjonell terminator kan også være operasjonelt bundet ved siden av 3'-enden i DNA-molekylet i
25 noen tilfeller, selv om nucleotidsekvensen representert ved formelen i figur 22, inneholder en slik terminatorsekvens.

Et tidligere definert DNA-molekyl ifølge figur 22 mangler et initieringskodon (ATG) ved siden av 5'-enden i sekvensen som begynner translasjon i et replikasjons/ekspresjons-medium. Et slikt kodon kan være ligert til et
30 definert DNA-molekyl i ramme, slik som omtalt ovenfor, eller kan være en del av vektornucleotidsekvensen som her eksemplifisert.

35 Human endotel-PAI er et utskilt protein, og inneholder således som naturlig uttrykt en såkalt polypeptid leder eller signalsekvens som hjelper til ved forflytning av proteinet gjennom plasmamembranen, og som kuttes bort ved en

etter-translasjonell hendelse. Bare en del av den utkodede polypeptid-ledersekvens for human endotel-PAI er inkludert i en tidligere definert DNA-molekylsekvens. Det eksempel-
5 vise DNA-molekyl som her er illustrert, uttrykkes i cytoplasmaet i replikasjons/ekspresjons-mediet, slik som E. coli, sammenlignet med periplasmarommet i cellene. Ekspresjon i cytoplasmaet til E. coli er vanlig for dette replikasjons/ekspresjons-medium.

De tidligere omtalte transkripsjonspromoter, trans-
10 lasjonsinitierende og translasjonsterminerende kodoner, og sekvens som koder for en polypeptid-ledersekvens når en slik anvendes, er normalt deler av den ikke-kromosomale vektor sammenlignet med et DNA-molekyl ifølge oppfinnelsen. For anvendelse i ekspresjon av det proteinlignende molekyl om-
15 fatter vektoren normalt også et ribosom-bindende sete (Shine-Delgado-sekvens) ved siden av 5'-enden i DNA-molekylet og beliggende oppstrøms fra initieringskodonet, noe som er velkjent. Vektorens promoter, slik som lacZ-promoteren som her benyttes, inneholder vanligvis et ribosom-bindende sete.

20 Vektorens nucleotidsekvens omfatter således, ved siden av de nucleotider som trengs for replikasjonen og den generelle vektorfunksjon, i ramme og fra 5'-ende til 3'-ende, et ribosom-bindende sete operasjonelt bundet ved siden av 5'-enden til en transkripsjonspromoter; denne pro-
25 moter operasjonelt bundet til 5'-enden i det translasjonsinitierende kodon; dette kodon operasjonelt bundet til 5'-enden i: (a) en ledersekvens for ekspresjon i eukaryoter, eller (b) en sekvens av en del av et annet molekyl som uttrykkes som et fusjonspolypeptid med den ønskede humane
30 endotel-PAI, eller (c) et DNA-molekyl ifølge oppfinnelsen; hvor (a) eller (b) er til stede, er denne sekvens operasjonelt bundet til 5'-enden i et DNA-molekyl ifølge oppfinnelsen. DNA-molekylet ifølge oppfinnelsen, som imidlertid er bundet ved siden av sin 5'-ende, er bundet ved siden av sin 3'-
35 ende til et translasjonsterminerende kodon. Som det fremgår av figur 22, kan ytterligere nucleotider også være til stede operasjonelt bundet til 3'-enden i det terminerende

* kodon så lenge som disse ytterligere nucleotider ikke griper
forstyrrende inn i transkripsjon og/eller translasjon,
ettersom disse hendelser er ønsket, eller kan gripe for-
styrrende inn i den immunologiske likhet hos et uttrykt pro-
teinlignende molekyl med human eller bovin endotel-PAI.
5 Helst griper eventuelle ytterligere nucleotider heller ikke
forstyrrende inn i den biologiske aktivitet mot plasmino-
genaktivatorer som utvises av uttrykt proteinlignende molekyl.

10 Det skal forstås at hele DNA-sekvensene i vektoren
må være forenlige med replikasjons/ekspresjons-mediet som
benyttes for å replikere DNA, og helst uttrykke et produkt
kodet for (utkodet av) et DNA-molekyl ifølge oppfinnelsen.
En vektor ifølge oppfinnelsen er i det minste i stand til å
replikere (propagere) et DNA-molekyl ifølge oppfinnelsen.
15 Helst er vektoren i stand til ikke bare å replikere et DNA-
molekyl, men er også i stand til å uttrykke eller trans-
latere genom-informasjonen til denne DNA i et rekombinant
proteinlignende molekyl som er immunologisk likt med human
endotel-PAI, slik det her er definert.

20 En ikke-kromosomal vektor ifølge oppfinnelsen behøver
ikke være begrenset til de vektorer som kan benyttes til
replikering og translasjon (ekspresjon) i E. coli som vert-
replikasjons-/ekspresjons-medium. Praktisk talt enhver
vektor som kan benyttes til replikering (propagering) av en
25 DNA-sekvens, kan benyttes til replikering av DNA-en, f.eks.
i pattedyr- eller eukaryote celler.

Et bredt utvalg av slike vektorer er kommersielt
tilgjengelige, noe som også gjelder for passende vert-
replikasjonsmedier. Eksempelvis vektorer, både plasmider
30 og bakteriofager, og verter, er tilgjengelige fra American
Type Culture Collection i Rockville, MD, og er oppført i
kultursamlingens Catalogue of Bacteria, Phages and rDNA
Vectors, 16. utg., 1985. I tillegg er plasmider, kosmider
og kloningsvektorer oppført som tilgjengelige i kataloger
35 fra Boehringer Mannheim Biochemicals of Indianapolis, IN;
Bethesda Research Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD, og
New England Biolabs, Inc., Beverly, MA.

Et annet aspekt ved oppfinnelsen er en i det vesentlige ren, rekombinant plasminogenaktivatorinhibitor av human endotelcelletype, dvs. at antistoffer fremkalt mot det rekombinante molekyl, reagerer immunologisk med naturlig forekommende plasminogenaktivatorinhibitor av human endotelcelletype. Som allerede bemerket, trenger det rekombinante molekyl ikke ha aminosyrerestsekvensen til det naturlig forekommende molekyl for å være anvendbart til å indusere utskillelsen av kryssreaktive antistoffer som er anvendbare i analyser. Som sådan kan dette molekyl translateres fra et replikasjons/ekspresjons-medium som inneholder en vektor med en passende translasjonell start og fortrinnsvis stoppkodoner, som allerede beskrevet. Den ovenfor beskrevne immunologiske likhet kan påvises ved å indusere antistoffer i kaniner etter fremgangsmåten beskrevet nedenunder i avsnitt III A 3 for bovin endotel-PAI.

Det i det vesentlige rene, rekombinante, proteinlignende molekyl har fortrinnsvis også noe, om ikke alt, av den biologiske aktivitet til human, endotelcelletype-PAI. Et slikt molekyl utgjør en annen utførelsesform av dette aspektet av oppfinnelsen.

I det vesentlige ren, rekombinant PAI av human endotelcelletype er således også omfattet. Det rekombinante molekyl binder seg til og inhiberer aktiviteten av human t-PA slik som bestemt ved hjelp av omvendt fibrinautografi som her beskrevet. Molekylet binder seg fortrinnsvis også til og inhiberer aktiviteten av u-PA.

Det rekombinante molekyl er immunologisk forskjellig fra protease-nexin og human morkake-PAI. En immunologisk forskjell mellom molekyler kan fastslås på en rekke måter og ut fra et antigen eller immunogent synspunkt. Den immunologiske forskjell mellom de tre molekylene påvises imidlertid lettest ved hjelp av en spesifikk bindingsundersøkelse under anvendelse av polyklonale antistoffer som binder seg til det rekombinante molekyl. Disse antistoffene er i det vesent-

lige frie for spesifikk binding med enten protease-nexin eller med human morkake-PAI.

Den rekombinante PAI av human endotelcelletype er immunologisk beslektet og lik med PAI av bovin endotelcelletype og naturlig forekommende PAI av human endotelcelletype, noe som bevises av det faktum at polyklonale antistoffer fremkalt mot den bovine PAI, reagerer immunologisk spesifikt med både den rekombinante og den naturlig forekommende PAI. I tillegg reagerer polyklonale antistoffer eller andre reseptorer fremkalt mot naturlig forekommende, human endotel-PAI, immunologisk med bovine og de uttrykte rekombinante PAI-molekyler. Likeledes binder polyklonale antistoffer eller andre reseptorer fremkalt mot det rekombinante molekyll immunologisk spesifikt til både naturlig forekommende PAI-molekyler av bovin og human endotelcelletype. Den uttrykte, rekombinante PAI av human endotelcelletype utviser således immunologisk kryssreaktivitet med naturlig forekommende, bovine og humane endotel-PAI-molekyler.

Den i det vesentlige rene, rekombinante PAI av human endotelcelletype er i det vesentlige fri for fremmedproteiner og -polypeptider, noe som kan bekreftes ved hjelp av SDS-PAGE-analyse etterfulgt av farging med Coomassie Brilliant Blue fargestoff. Den ønskede renhet kan oppnås f.eks. ved bruk av en affinitetsskolonne eller annet sorberingsmiddel inneholdende festede polyklonale antistoffer mot bovin endotel-PAI som den sorberende rest, etterfulgt av standard eluerings- og proteinrensingsteknikker.

I en spesiell utførelsesform er den rekombinante PAI av human endotelcelletype i det vesentlige fri for polypeptidbundne glycosylgrupper som er det eksempelvis fusjonspolypeptid som her er beskrevet. Slike molekyler uttrykkes vanligvis ved å bruke et procaryotisk replikasjons/ekspresjons-medium slik som E. coli.

Den rekombinante PAI av human endotelcelletype kan også inneholde polypeptidbundne glycosylgrupper. Det glycosylerte molekyll uttrykkes vanligvis fra eukaryote celler som replikasjons/ekspresjons-medium, slik som patte-

- dyrceller eller celler fra hamsterlivmor (CHO) eller COS-celler under anvendelse av f.eks. en SV40-utvunnet eller annen vektor, noe som er velkjent.

Et eukaryot replikasjons/ekspresjons-medium og passende vektor, slik som CHO-celler, og en SV40-utvunnet vektor eller et gjær-replikasjons/ekspresjons-medium, slik som *S. cerevisiae* og passende vektor, slik som en vektor utvunnet fra pTDT1, er også særlig anvendbar når det uttrykte, rekombinante molekyll ønskes å bli utskilt i dyrkningsmediet. En nucleinsyresekvens som koder for en leder- eller signalpeptidsekvens, brukes til ekspresjon av det rekombinante molekyll i dyrkningsmediet.

Som tidligere omtalt, kan andre genetiske signaler være inkludert i konstruksjonene for å lette utskillelse av PAI fra cellen og i dyrkningsmediet. Dette forbedrer rensningsfremgangsmåten. Både i prokaryote og eukaryote systemer virker et "lederpeptid" i aminoenden til proteinet som et signal for utskillelse. Dette lederpeptidet spaltes av ved hjelp av cellulær protease fra verten slik at det fullt ferdige protein dannes.

For å frembringe et slikt protein som inneholder en ledersekvens, konstrueres "fusjons"-polypeptider hvor det nucleotidkodende område for lederpeptidet i et kjent, utskilt protein ligeres i den samme avlesningsramme til 5'-enden i det kodende område for PAI som skal uttrykkes og utskilles. Ettersom spaltingssignalene er til stede på lederpeptidet og den spaltingsavhengige protease er i verten, fås normal utskillelse.

Denne fusjonsproteinstrategi har med hell blitt anvendt både i gjær- og i CHO-celler. F.eks. beskriver Filho et al., *Biotechnology*, 4:311, 1986, en konstruksjon for gjærekspresjon hvor lederpeptidet fra gjær-alfa-faktor inkludert proteasespaltingssignalet, er fusjonert til det eukaryote protein mus-alfa-amylase, drives av alfa-faktor-promoter og resulterer i utskillelse i mediet av fullt ferdig protein. Andre lignende konstruksjoner som bruker alfa-faktor-genpromoter, er blitt rapportert å uttrykke

fremmedproteiner i gjær; [Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81:5530 (1984); Brake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81:4642 (1984) og Singh et al., Nucleic Acid Res., 12:8927 (1984)].

5 I pattedyrcelle-ekspresjonssystemer er lederpeptidet fra Herpes Simplex Virus glycoprotein D funnet å fusjonere til deler av kappeglycoproteinet fra HTLV III. Fusjonspolypeptidet ble utskilt i CHO-celler (Lasky et al., Science, 233:209 (1980)).

10 Fremgangsmåter for å øke produksjon er blitt rapportert hvor kopiantallet av det transfiserte plasmid opprettholdes på et høyt antall pr. celle. Dette oppnås ved å inkludere en selekterbar markør, slik som en dihydrofolat-reduktase (dhfr) på ekspresjonsplasmidet og dyrke de trans-
15 formerte celler som er fattige på dhfr i nærvær av medium som krever høye nivåer av dhfr for vekst [Simonsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:2495 (1983)]. Likeledes kan en SV40-basert vektor, slik som pKSV-10 som inneholder et SV40-opprinnelsessted for replikasjon, oppbevares i COS-
20 celler ved et høyt kopiantall ettersom COS-cellene også inneholder et mangelfullt SV40 virusgenom som fortrinnsvis stimulerer ekspresjonsvektorens SV40 opprinnelse for å replikere autonomt i vertcellens cytoplasma [Gluzman, Cell, 23:175 (1981)].

25 I tillegg kan, som allerede bemerket, det rekombinante proteinet uttrykkes i flere former. I en utførelsesform uttrykkes det som et protein med aminosyrerestsekvens som er den som er angitt ved hjelp av den utledede formel vist i figur 22 fra ca. aminosyrerestposisjon 1 (DNA-nucleotidnumrene 13-15) til og med aminosyrerestposisjon
30 379 (DNA-nucleotidnumrene 1154-1157). Således uttrykt og i det vesentlige fri for polypeptidbundne glycosylgrupper, utviser det rekombinante protein en tilsynelatende relativ molekylmasse (M_r) på ca. 40.000 dalton [40 kilodalton (kda)]
35 bestemt ved hjelp av SDS-PAGE-analyse. I en annen utførelsesform uttrykkes PAI som del av et fusjonspolypeptid med en M_r på ca. 180 kda ved hjelp av SDS-PAGE-analyse, og inneholdende en del av beta-galactosidasemolekylet opera-

• sjonelt bundet ved hjelp av en peptidbinding til aminoende-aminosyreresten med den formel som er vist i aminosyrerestposisjon -4 (nucleotidposisjonene 1-3) i figur 22. Begge disse eksempelvis molekylar utviste biologisk aktivitet
5 svarende til aktiviteten av human endotelcelle-plasminogen-aktivatorinhibitor ved at de er i stand til å binde til og inhibere aktiviteten av u-PA i omvendt fibrinautografi, slik det er omtalt nedenunder og illustrert i figur 21. Det rekombinante protein kan også uttrykkes med en aminoende-
10 lederpolypeptidsekvens, slik som allerede beskrevet.

Slik det fremgår av den tidligere omtale, er den i det vesentlige rene, rekombinante PAI av human endotelcelle-type anvendbar i fast fase kompetitive analysesystemer når den er festet til en fast matriks som en del av en fast
15 bærer. Den rekombinante PAI kan også anvendes som et immuno-gen brukt til å fremkalle antistoffer for bruk som reseptor-molekyler i andre analysesystemer. Denne sistnevnte anvendelse er lik med anvendelsen av det i det vesentlige rene, rekombinante, proteinlignende molekyl som ikke behøver
20 å ha biologisk aktivitet.

Anvendt på denne måten, og særlig når det brukes festet til en fast matriks som del av en fast bærer i en analyse, er det ikke av stor betydning at proteinet eller fusjonspolypeptidet er i det vesentlige fritt for bakterie-
25 lipopolysaccharid (LPS) eller andre bakterielle, cellulære produkter som er kjent for ofte å forurensa protein-lignende materialer fremstilt ved hjelp av rekombinant-teknikker. Når det imidlertid er ønskelig med hovedsakelig frihet fra LPS, som når materialet benyttes som et immunogen,
30 kan det benyttes godt kjente teknikker for å fremstille den PAI som i det vesentlige er fri for bakterie-LPS og andre bakterielle cellerester. Se f.eks. Issekutz (1983), J. Imm. Methods, 61, 271-281 og Sofer, BIO/TEC-NOLOGY, desember 1984, 1035-1038 og henvisningene der. Replika-
35 sjons/ekspressjons-mediet kan også reguleres, som ved bruk av gjæren *S. cerevisiae* eller pattedyrceller, slik som tidligere omtalt, som ekspressjonsmediet sammen med en egnet

vektor som er kjent.

II. RESULTATER

A. Rensing av den bovine aortaendotelcelleinhibitor (BAE)

5 Det var tidligere blitt vist at CM (som beskrevet i avsnitt III A 1 og 2 nedenunder, og i de følgende litteratursteder) fra BAE-er inneholdt plasminogenaktivatorer både av vevtype (t-PA) og urokinasetype (u-PA), Levin et al., J. Cell Biol., 94, 631 (1982), samt en inhibitor for fibrinolyse, Loskutoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA),
10 80, 2956 (1983). Fraksjonering av denne CM ved affinitetskromatografi på concanavalin A-"Sepharose" avslørte at u-PA- og t-PA-ene kunne skilles fra hverandre, Loskutoff et al., Blood, 62, 62 (1983), og antydnet at denne fremgangsmåte også
15 ville være anvendbar for rensingen av inhibitoren.

En liter CM ble tilført en concanavalin A-"Sepharose"-kolonne, og kolonnen ble behandlet som beskrevet i avsnitt III nedenunder. Toppfraksjonene ble slått sammen, fraksjonert ved SDS-PAGE og analysert med hensyn på protein ved
20 farging med Coomassie Brilliant Blue, og med hensyn på tilstedeværelse av fibrinolytiske aktivatorer og inhibitorer ved hjelp av omvendt fibrinautografi. Som vist i figur 1, ble mer enn 85% av det protein som ble tilført kolonnen, utvunnet i den gjennomløpende effluent (blanding I). Denne
25 fraksjon inneholdt både albumin og u-PA, men ingen inhibitor. Noe inhibitor ble påvist i blanding III, fraksjonen som inneholdt mesteparten av utvunnet t-PA-aktivitet, Loskutoff et al., Blood, 62, 62 (1983), men utgjorde mindre enn 20% av den samlede inhibitor bedømt ved hjelp av den relative
30 størrelse av lyse-resistens-sonene, Erickson et al., Anal. Biochem., 137, 454 (1984). Mesteparten av påvisbar inhibitoraktivitet ble utvunnet i concanavalin A, blanding II-fraksjonen, slik som vist i innskuddet i figur 2, en fraksjon som inneholdt bare 5% av det samlede protein. Den
35 syntes å forflytte seg sammen med en av de viktigste fargede proteiner.

Concanavalin A, blanding II, ble også analysert ved hjelp av SDS-PAGE i rørgeler, og resultater er vist i

figur 2. Etter elektroforese ble gelen skåret i skiver og ekstrakter fra skivene testet med hensyn på evne til å inhibere u-PA-mediert lyse av ^{125}I -fibrin. Igjen ble inhibitoraktivitet påvist i et enkelt område av gelen og forflyttet seg med en relativ mobilitet (R_f) som ikke lot seg skjelne fra den relative mobilitet til den lyse-resistente sone vist i innskuddet i figur 2 (dvs. $R_f = 0,6$). Få andre proteiner ble påvist i dette område av gelen, noe som tyder på at rensingen kunne fullføres ved ekstraksjon av inhibitor ut av slike geler.

Ekstraktene med den største inhibitoraktivitet (figur 2, skivene 49-52) ble slått sammen og analysert på nytt på 7,5-20% gradientgeler, og resultatene er vist i figur 3. Et enkelt protein ble påvist når gelen var farget med Coomassie Brilliant Blue (figur 3, felt 1) eller perjodsyre/Schiff-reagens (figur 3, felt 2), og det forflyttet seg sammen med inhibitoren slik det ble avslørt ved hjelp av omvendt fibrinautografi (figur 3, felt 3). Mengden av inhibitorantigen som er til stede i utgangs-CM og i de forskjellige sammenslåtte fraksjoner, ble bestemt ved hjelp av "rakett"-teknikken til Laurell, Scand. J. Clin. Lab. Invest, 29, 21 (1977), under anvendelse av antisera utviklet mot den rensede inhibitor.

Disse screeninger indikerte at CM inneholdt 0,6 mikrogram/ml ($\mu\text{g/ml}$) inhibitor, at 600 mikrogram inhibitor ble tilført concanavalin A-kolonnen (figur 1) og at 90 mikrogram ble utvunnet fra sluttgelelektene (figurene 2 og 3). Denne rensingsfremgangsmåte ga således en utvinning av omtrent 15% av utgangsantigenet. Den rensede inhibitor hadde en tilsynelatende relativ molekylmasse (M_r) på ca. 50.000 ± 2.500 dalton under både reduserende og ikke-reduserende betingelser når det ble sammenlignet direkte med M_r -standarder.

B. Preliminær karakterisering av den rensede inhibitor

PA-er omdanner enkjede-plasminogen til tokjede-plasmin ved spalting av en enkel arginin-valin-binding,

Summario et al., J. Biol. Chem., 242, 4279 (1967). Denne prosess kan overvåkes ved hjelp av SDS-PAGE i nærvær av reduksjonsmidler, Mussoni et al., Thromb. Res., 34, 241 (1984); Summario et al., J. Biol. Chem., 242, 4279 (1967);
5 Dano et al., Biochim. Biophys. Acta, 566, 138 (1979). For å bestemme hvorvidt inhibitoren var en anti-aktivator, ble dens evne til å inhibere denne spalting fastlagt, og resultatene er vist i figur 4. Den rensede inhibitor blokkerte både u-PA's og t-PA's evne til å spalte ¹²⁵I-plasminogen i
10 dets karakteristiske tunge og lette kjeder og gjorde dette på en doseavhengig måte. Inhibering av t-PA var forbundet med dannelsen av et kompleks av enzym og inhibitor som fortsatt var synlig etter SDS-PAGE som vist i figur 5.

Inhibitoraktiviteten til det rensede molekyl ble,
15 på samme måte som den som ble påvist i CM, samlet opp fra sammenflytende BAE-er, Loskutoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 80, 2956 (1983), ikke ødelagt etter inkubering ved pH 2,7 i 60 minutter ved 37°C, eller etter eksponering mot SDS som vist i figur 6. I motsetning til dette ble
20 inhibitoraktiviteten av rensede protease-nexin opphevet ved hjelp av disse samme behandlinger. Inhibitoraktiviteten til disse proteiner ble ikke påvirket ved inkubasjon i 30 minutter ved 37°C i nærvær av 5% 2-mercaptoethanol.

25 C. Rensing av inhibitoren fra BAE-er dyrket i nærvær av L[3,4,5-³H]-leucin

Både plasma og serum inneholder inhibitorer for fibrinolyse, Loskutoff, J. Cell Physiol., 96, 361 (1978); Mullertz, i Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Davidson et al. red., vol. 3, s. 213-237, Raven Press,
30 New York (1978); Collen, Thromb. Haemostas., 43, 77 (1980). Dyrkede endotelceller kan ta opp i seg eller binde disse serumproteiner og deretter frigjøre dem tilbake til det serumfrie medium, Cohen, J. Clin. Invest., 52, 2793 (1973); Pastan et al., Cell, 12, 609 (1977); Rohrich et al.,
35 J. Cell Physiol., 109, 1 (1981); McPherson et al., J. Biol. Chem., 256, 11330 (1981), under fremstillingen av CM. For

å bestemme hvorvidt inhibitoren faktisk ble syntetisert ved hjelp av BAE-er, eller ganske enkelt var en forurensende seruminhibitor, ble inhibitoren rensset fra CM fra celler dyrket i nærvær av L[3,4,5-³H]-leucin under anvendelse av den samme fremgangsmåte som den som ble utviklet for rensingen av inhibitoren fra umerket CM. To topper av radioaktivt merkede proteiner ble utvunnet når concanavalin A-"Sepharese"-kolonnen ble eluert med alfa-methyl-mannosid i nærvær av lavt og høyt saltinnhold. Fraksjonene fra topp II inneholdende inhibitor, ble slått sammen og underkastet videre analyse ved hjelp av SDS-PAGE, og resultatene er vist i figur 7. Både inhibitoraktivitet og mesteparten av radioaktiviteten ble utvunnet i de samme fraksjonene. Disse to aktivitetene forflyttet seg også sammen når topp-inhibitorfraksjonene (fraksjonene 52, 53 i figur 7) ble slått sammen, dialysert og underkastet etterfølgende analyse ved hjelp av alkalisk PAGE (figur 8). Tilsammen indikerte disse data at inhibitoren var et biosyntetisk produkt fra cellene og ikke et forurensende serumprotein.

Screening ved immunutfelling ble utført både for å bekrefte resultatene ovenfor og for å kvantifisere inhibitorsyntese ved hjelp av klonede BAE-er. Resultatene er vist i figur 9 og i tabell I nedenunder.

TABELL I
Inhibitorsyntese ved BAE-er

5	Celle isolert ^b	CM	CPM utvunnet ^a		
			Sammen- slåtte fraksjoner II	Gelekstrakt	Immunutfelling
10	BAE ₂₆	9,3x10 ⁶ (100%)	2,9x10 ⁶ (30%)	1,2x10 ⁶ (12%)	-
	Klon A	3,2x10 ⁷ (100%)	-	-	8,2x10 ⁵ (2,5%)
	Klon B	4,5x10 ⁷ (100%)	-	-	1,5x10 ⁶ (3,4%)

^aDen samlede, TCA-utfellbare radioaktivitet i de forskjellige fraksjoner og i immunutfellingene ble bestemt ved hjelp av standardfremgangsmåter som er godt kjent innen teknikken. Dataene er normalisert til prosentandelen (vist i parentes) av cpm i utgangsmaterialet (CM) utvunnet i hvert trinn.

^bI hvert tilfelle ble omtrent 1,5x10⁷ celler merket med L[3,4,5-³H]-leucin (20 Ci/ml) i 24 timer som beskrevet i avsnitt III nedenunder. Den serumfrie CM (15 ml) ble samlet opp og fraksjonert som angitt.

I disse immunologiske screeninger ble radioaktivt merket CM samlet opp fra klonede BAE-er, inkubert (holdt under biologiske prøvebetingelser) med tilblandet antistoff mot den rensede inhibitor. Det bundne materiale ble ekstrahert fra antistoff-protein A-"Sephacrose"-kulene, fraksjonert ved hjelp av SDS-PAGE og analysert ved autoradiografi (figur 9). Et enkelt radiomerket polypeptid med en omtrentlig M_r på 50.000 dalton ble avslørt, og det hadde

inhibitoraktivitet når det ble analysert ved hjelp av omvendt fibrinautografi. Dette protein adsorberte ikke til protein A-"Sepharose"-kuler fremstilt med preimmunserum. Den totale radioaktivitet utvunnet fra de forskjellige CM-er
5 analysert i disse immunutfellings-screeninger, og utvinningen av radiomerket protein på hvert trinn av rensingen (figurene 7-8; tabell I), indikerer at inhibitoren utgjør mellom 2,5-12% av det samlede protein syntetisert og utskilt ved hjelp av cellene i et tidsrom på 24 timer (tabell I).

10 D. Utvikling og evaluering av en funksjonell prøve på inhibitor (inhibitor-bindingsprøve)

Polyvinylklorid (PVC) plastbrønner ble belagt over natten ved 4°C med varierende konsentrasjoner av t-PA for å feste t-PA til den faste polyvinylkloridmatriks, og for å
15 bestemme de optimale konsentrasjoner av t-PA for prøven ifølge foreliggende oppfinnelse, slik som vist i figur 10. Brønnene ble vasket, blokkert med BSA for å fjerne ikke-spesifikke proteinbindende seter og holdt (inkubert) i 2 timer ved 37°C med tre forskjellige konsentrasjoner av
20 renset inhibitor (20, 50 og 100 ng/ml) for å danne komplekser. Etter vasking ble utstrekningen av binding kvantifisert ved inkubering (oppbevaring under biologiske prøvebetingelser) av de således dannede komplekser først med tilblandet kanin-anti-inhibitor-reseptor (fortynnet 1:100)
25 etterfulgt av tilblandet ^{125}I -geit-anti-kanin-IgG ($1,5 \times 10^5$ cpm/brønn). Etterhvert som t-PA-konsentrasjonen brukt til å belegge PVC-brønnene ble økt fra 0,1 til 1,0 mikrogram/ml, økte påvisningen av bundet inhibitor ved alle tre konsentrasjoner (figur 10). Øking av t-PA-belegningskonsentrasjon over 1 mikrogram/ml økte ikke påvisningen
30 av bundet inhibitor. Med etterfølgende screeninger ble det således anvendt en t-PA-konsentrasjon på 1 mikrogram/ml for belegning av PVC-brønnene for å feste t-PA til disse.

Kinetikken ved reaksjonen mellom inhibitoren og
35 immobilisert t-PA ble bestemt for å optimalisere oppbevaringsperioden (inkubasjonen) for inhibitorholdige oppløsninger. Renset inhibitor (100 ng/ml) ble inkubert ved 37°C

i varierende tidsrom på enten t-PA- eller BSA-belagte brønner. Den bundne inhibitor ble så kvantifisert med kanin-anti-inhibitor-reseptoren (1:100) etterfulgt av ^{125}I -geit-anti-kanin-IgG ($1,5 \times 10^5$ cpm/brønn). Reaksjonen mellom inhibitoren og immobilisert t-PA var en hurtig reaksjon med over 75% binding oppstått innen 30 minutter (figur 11). Under dette tidsrommet bandt inhibitoren seg ikke til kontroll, BSA-belagte brønner. For lettvinthets skyld ble en 1-times inkubasjonstid for inhibitorholdige oppløsninger brukt i etterfølgende screeninger.

Oppbevaringstiden (inkubasjon) for bindingstiden mellom polyklonal reseptor og indikasjonsmiddel ble optimalisert på lignende måte. t-PA- eller BSA-belagte brønner ble inkubert i 1 time ved 37°C med inhibitoren (50 ng/ml) og deretter inkubert med kanin-anti-inhibitor-reseptoren i forskjellige tidsrom. Bundet reseptor ble påvist ved hjelp av en 2 timers inkubasjon med indikatoren (^{125}I -geit-anti-kanin-IgG). Alternativt ble brønnene inkubert i 2 timer med reseptoren, og inkubasjonstiden for indikatoren ble variert. Både reseptoren og indikatoren bandt seg hurtig med sine respektive antigener i prøven, idet over 80% binding oppsto etter 1,5-2 timer (figur 12). Ved etterfølgende screeninger ble det derfor anvendt en 2 timers inkubasjonsperiode både for reseptoren og indikatoren.

Virkningen av varierende fortynninger av kanin-anti-inhibitor-reseptor på påvisningen av inhibitor ble bestemt for å optimalisere prøvens sensitivitet. t-PA-belagte brønner ble inkubert i 1 time ved 37°C med forskjellige konsentrasjoner av inhibitor (1-100 ng/ml). Etter vasking ble brønnene inkubert med forskjellige fortynninger av kanin-anti-inhibitor-reseptor (1:50-1:500), og det bundne antistoff ble påvist med ^{125}I -geit-anti-kanin-IgG ($1,5 \times 10^5$ cpm/ml). Optimal påvisning av inhibitor oppsto ved en fortynning på 1:50-1:75 av antiseraene (figur 13). Ved etterfølgende screeninger ble det anvendt en 1:75 fortynning av antisera. Virkningen av varierende konsentrasjoner av ^{125}I -geit-anti-kanin-IgG ($2,5 \times 10^4$ - 3×10^5 cpm/

brønn) ble likeledes undersøkt for å optimalisere prøvens sensitivitet. Optimal påvisning av inhibitor oppsto ved $2,5-5 \times 10^4$ cpm/brønn av ^{125}I -geit-anti-kanin-IgG (figur 14).

5 En typisk standarddose-responskurve for rensset inhibitor påvist i denne prøve, er vist i figur 15. Prøven var sensitiv til 1 ng/ml, oppviste en lineær respons på inhibitor mellom 10 og 100 ng/ml og mettet ved inhibitor-konsentrasjoner over 250 ng/ml. En doserespons under anvend-
10 else av bovine aorta-endotelcelle-kondisjonerte medier (CM) er også vist i figur 15. Sammenligning av denne kurve med standardkurven indikerer at denne CM-prøve inneholdt omtrent 100 ng/ml funksjonelt aktiv inhibitor. For lettvinthets skyld ble standardkurven rutinemessig plottet på en log vs.
15 log-plot for det formål å beregne inhibitorkonsentrasjoner i ukjente prøver (figur 16). Det vil ses at plotting på denne måte ga en rett linje.

E. Sammenligning av inhibitor-bindingsprøven med omvendt fibrinautografi

20 Sensitiviteten ved den funksjonelle prøve (inhibitor-bindingsprøve) ifølge foreliggende oppfinnelse ble sammenlignet med sensitiviteten ved den annen prøve, omvendt fibrinautografi, som vanligvis brukes for påvisning og
25 kvantifisering av PA-inhibitor. Forskjellige konsentrasjoner av inhibitor (0,5 ng-10 ng/felt) ble fraksjonert ved hjelp av SDS-PAGE og deretter analysert ved omvendt fibrinautografi. Resultatene er vist i figur 17. Ved denne teknikken ble den vaskede polyacrylamidgel lagt på en indikatorgel
30 inneholdende fibrin, plasminogen og en PA. Plasmin ble sakte dannet, noe som resulterte i den generelle oppløsning av gelen bortsett fra i områder hvor inhibitorer var til stede i den tilsvarende polyacrylamidgel. Sensitiviteten ved omvendt fibrinautografi var 2,5 ng/felt (figur 17), og
35 ettersom 0,1 ml ble tilført hvert felt, var dens sensitivitet 25 ng/ml, eller 25 ganger mindre følsom enn inhibitor-bindingsprøven.

F. Anvendelser av inhibitor-bindingsprøven

Inhibitor-bindingsprøven ifølge foreliggende oppfinnelse ble brukt til å undersøke reaksjonen mellom rensede enzymer og inhibitoren. Tre rensede PA-er (t-PA, u-PA og streptokinase) ble forinkubert i 1 time ved 37°C med den rensede inhibitor (50 ng/ml), og inhibitorens evne til deretter å binde seg til t-PA ble kvantifisert i inhibitor-bindingsprøven. Exogent tilsatt t-PA og u-PA ble funnet å konkurrere med den immobiliserte t-PA om binding til inhibitoren, med en 50% reduksjon i binding oppnådd ved 12 ng/ml av t-PA og 6 ng/ml av u-PA, slik som vist i figur 18. Hverken streptokinase eller DFP-inaktivert t-PA (data ikke vist) påvirket bindingen av inhibitoren til immobilisert t-PA.

Inhibitor-bindingsprøven ifølge oppfinnelsen ble også brukt til å påvise inhibitor i humanplasma og -serum. Plasma og serum ble fremstilt fra blod samlet inn fra 16 friske menneskedonorer og inhibitoraktiviteten i hver prøve målt i inhibitor-bindingsprøven. Normal humanplasma inneholdt lave eller ikke påvisbare nivåer av inhibitor, slik som vist i figur 19. I motsetning til dette inneholdt serum fra disse donorene høye nivåer av inhibitoraktivitet, som også vist i figur 19.

Endelig ble prøven anvendt til å bestemme og sammenligne inhibitornivåer i plasma fra normale donorer og donorer med antatt unormaliteter i sitt hemostatiske system. Resultatene er vist nedenunder i tabell II.

TABELL II

Påvisning av inhibitor i normalt og pasient-plasma

5	Prøve	Fortynning	cpm bundet	Inhibitor (ng/ml)
	Normalt plasma	1:5	1500	N.D. ¹
		1:10	700	N.D.
10	Pasient-plasma	1:5	4700	25
		1:10	2300	25

¹ "N.D." indikerer ingen inhibitor påvist (mindre enn 2 ng/ml).

15

Disse prøvene ble vennligst tilveiebrakt av dr. B. Wiman. Av denne screening kan det ses at ingen inhibitor ble påvist i normalplasma, mens pasientplasmaet hadde omtrent 25 ng/ml. Den samme pasient ble påvist å ha forhøyet inhibitor når han ble undersøkt med en annen prøve i Wiman, Thrombosis Research, 31, 427 (1983).

20

G. Identifikasjon av beta-PAI-aktivitet av endotelcelletype i morkake

To inhibitorsoner med en M_r på ca. 50-55 kilodalton (kda) ble avslørt når 20 mikroliter (μ l) av en urensset, human morkakeekstrakt ble analysert med hensyn på PAI-aktivitet ved hjelp av SDS-PAGE [Laemmli, (1970) Nature (London), 227, 680-685] og omvendt fibrinautografi (RFA) [Erickson et al., (1984) Analytical Biochemistry, 137, 454-463]. Immunutfellingsundersøkelser viste at de to inhibitorsonene skrev seg fra tilstedeværelsen av både PAI av morkaketype [Astedt et al., (1985) Thromb. Haemostasis, 53, 122-125] og PAI av endotelcelletype [Loskutoff et al., (1983) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 80:2956-2960; Emeis et al., (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 110:392-398; Thorsen et al. (1984) Biochim. Biophys. Acta, 802, 111-118; van Mourik et al., (1984) J. Biol. Chem. 259, 14914-14921].

35

Kvantifisering under anvendelse av en radioimmunprøve [Schleef et al. (1985) J. Lab. Clin. Med. 106, 408-415] indikerte at ekstraktet inneholdt 270 nanogram pr. milliliter (ng/ml) av endotel (beta-) PAI.

Ettersom morkakevevet var blitt grundig vasket før ekstraksjon, ble denne beta-PAI mest sannsynlig syntetisert av celler inneholdt i morkaken, og var ikke en serumforurensning. Morkake ble derfor anvendt som en kilde for isoleringen av cDNA for beta-PAI.

H. Isolering av human beta-PAI-cDNA

Omtrent 7×10^5 rekombinante fager fra en λ gt₁₁-ekspresjonssamling inneholdende cDNA-innskudd fremstilt fra human morkake-mRNA, ble erholdt fra dr. Jose Millan, Cancer Research Center, La Jolla Cancer Research Foundation, La Jolla, CA. Denne ekspresjonssamling er beskrevet i Millan, (1986) J. Biol. Chem. 261, 3112-3115, og inneholder 1×10^6 uavhengige, rekombinante fager.

Cytoplasmaekstrakter fra den fag-infiserte E. coli ble undersøkt immunologisk for å identifisere de fagene som inneholdt klonede cDNA-er som uttrykte beta-PAI, eller et fusjonspolypeptid omfattende PAI fusjonert i sin aminoende til en del av beta-galactosidasemolekylet som kodet for av λ gt₁₁-vektoren. 34 positive kloner ble erholdt, halvparten av disse fortsatte å være positive gjennom en andre screening. Tre positive kloner ble tilfeldig valgt ut og plakk-renset, og fag-DNA ble fremstilt.

Fag-DNA fra de tre klonene betegnet λ 1,2, λ 3 og λ 9,2, ble oppløst med EcoRI, og cDNA-innskudd ble bestemt å være hhv. 1,9, 3,0 og 1,9 kilobasepar (kb) i lengde. EcoRI 3,0 kb cDNA-innskuddet fra λ 3 ble subklonet inn i en pBR322-avledet plasmidvektor, pGEM-3, for å danne det rekombinante plasmid pPAI₃ under anvendelse av E. coli MC1061 som et encellet replikasjons/ekspresjons-medium som beskrevet av Bolivar et al., (1977) Gene, 2, 95-113. Det subklonede cDNA-innskudd ble skåret ut med EcoRI og renset under anvendelse av en agarosegel. cDNA-innskuddet ble "nick"-translatert og vist å hybridisere med λ 1,2- og λ 9,2-DNA-er ved høy stringens, noe som indikerer at DNA-

innskuddene i de tre klonene var beslektet.

Tre beviskjeder understøtter den konklusjon at de tre isolerte kloner koder for et proteinlignende materiale som er eller omfatter (beta-migrerende) PAI av human endo-
telcelletype.

(i) Induksjon av en *E. coli* lysogen stamme fremstilt ved å infisere en stor hyppighet av lysogeni-stamme (Y1089, ATCC 37196) med λ 9.2, resulterte i ekspresjonen av et rekombinant fusjonspolypeptid med en tilsynelatende relativ masse på ca. 180.000 dalton ($M_r = 180$ kda) som ble gjenkjent av en affinitetsrenset IgA fra antiserum fremkalt mot den rensede BAE-beta-PAI (figur 20, felt B). En *E. coli*-stamme som er lysogen for λ gt₁₁, og følgelig mangler cDNA-innskuddet, produserte ikke et slikt immuno-reaktivt protein (figur 20, felt C).

(ii) Det 180 kda rekombinante fusjonspolypeptid og BAE-beta-PAI har til felles antigene epitoper, ettersom affinitetsrensing av antiserumet mot BAE-beta-PAI på det rekombinante fusjonspolypeptid ga antistoffer som gjenkjente den rensede BAE-beta-PAI i "Western blots" (figur 20, felt D).

(iii) Analyse av *E. coli*-ekstrakter ved hjelp av SDS-PAGE etterfulgt av RFA avslørte at den λ 9.2 lysogene stamme inneholdende det 1,9 kb store innskudd, men ikke den λ gt₁₁-lysogene stamme, uttrykker PAI-aktivitet (figur 21, felt B).

Overraskende var to rekombinante, proteinlignende PAI-er med M_r s på hhv. 180 kda og 40 kda, til stede i

λ 9.2-ekstraktene. For å undersøke slektskapet mellom disse PAI-er ble proteiner fra de lysogene stammer fraksjonert ved hjelp av SDS-PAGE, og ble på nytt analysert ved hjelp av "Western blotting", men denne gang ble autoradiogrammene fremkalt etter en lengre eksponering (figur 21, feltene E og F). To polypeptider ble påvist, og disse forflyttet seg sammen med inhibitoraktivitetene (sammenlign feltene B og E). Det aller meste av beta-PAI-antigenet

produsert ved hjelp av den λ 9.2-lysogene stamme ble påvist ved en M_r på omtrent 180 kda, en liten mengde av antigen ble imidlertid også vist ved M_r 40 kda (figur 21, felt E). Ettersom de to PAI-er har til felles immunologiske og biologiske egenskaper, er det mest sannsynlig at den minste er avledet fra den største gjennom proteolytisk bearbeiding av beta-galactosidase-PAI-fusjonspolypeptidet. Den spesifikke aktivitet til det frigjorte 40 kda protein kan være høyere enn aktiviteten til det største fusjonsproteinet fordi det ikke lenger er sterisk hindret av et fusjonert polypeptidfragment. Selv til tross for en lavere spesifikk aktivitet, sannsynligvis forårsaket av sterisk hindring, utviste imidlertid det 180 kda store fusjonspolypeptid plasminogenaktivator-inhiberende aktivitet og ble påvist å være immunologisk beslektet (likt) med BAE-PAI.

Den iaktatte biologiske aktivitet (binding til og inhibering av) t-PA-aktivitet var overraskende for såvidt som replikasjons/ekspresjons-mediet var en procaryot celle, og det proteinlignende molekyl er naturlig forekommende for pattedyr. I tillegg glycosyleres det naturlig forekommende molekyl mens det uttrykte fusjonspolypeptid og det mindre 40 kda protein var i det vesentlige fri for glycosylering. Så selv om de uttrykte proteinlignende molekyler kunne forventes å være foldet på annen måte enn det naturlig forekommende molekyl, og var fri for glycosylering, mens det naturlig forekommende molekyl er glycosylert, utviste de uttrykte proteinlignende molekyler den biologiske aktivitet til det naturlig forekommende pattedyrprotein.

Rekombinant plasmid pPAI₃ inneholdt i vert E. coli-stamme MC1061, ble deponert ved American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Den ble mottatt 19. august 1986 og ble gitt betegnelsen ATCC 67188.

Foreliggende deponering ble gjort i overensstemmelse med Budapest-konvensjonens krav om at varigheten av deponeringen skal være 30 år fra deponeringsdagen, 5 år etter den siste forespørsel eller deponeringen ved deponeringsinstitusjonen, eller den tiden et US patent som skriver seg

fra en søknad svarende til foreliggende søknad, er i kraft, idet det tidsrom som utløper sist, skal gjelde. De rekombinante, plasmidholdige celler vil bli erstattet dersom de skulle bli ikke-levedyktige ved deponeringsinstitusjonen.

I. Nucleotidsekvens i DNA som koder for human beta-PAI og anvisning av proteinsekvens

DNA-sekvensen fra begge molekyltrådene i det 3,0 kb store cDNA-innskudd i klon λ 3 ble fastslått ved sekvensbestemmelse av "deletion" subkloner konstruert ved hjelp av fremgangsmåten til Dale et al. (1985) Plamid 13, 31-40. Figur 22 viser DNA-sekvensen sammen med den utledede aminosyrerestsekvens. Dette er ikke en full-lengde cDNA etter-
som det ikke-translaterte område, initieringskodonet og mesteparten av signalpeptidet mangler fra 5'-avslutningsenden til molekylet.

For å identifisere kodonet som koder for aminoenden i det fullt ferdige protein, ble den utledede aminosyrerestsekvens stilt opp ved siden av den delvis sekvenserte bovine beta-PAI og delvis sekvenserte humane endotel-PAI isolert ved hjelp av andre midler i vårt laboratorium. Aminoenderesten i fullt ferdig PAI av human endotelcelletype ble bestemt å være valin (Val; V). Basert på denne oppstilling er valinet betegnet nr. 1 i figur 22, aminoenderesten i den humane endotel (beta-) PAI.

To opprinnelige erholdte kloner inneholdt forskjellige kodoner i -4-aminosyrerestposisjonen. En av disse kodonene koder for en serinrest (Ser; S) (λ 3), mens den andre (λ 9.2) koder for en glutaminsyrerest (Glu; E). Glutaminsyre er funnet å være den korrekte rest i denne posisjon og er vist slik i figur 22.

Den naturlig forekommende, humane beta-PAI utskilles og inneholder derfor sannsynligvis et signalpeptid [Blobel et al., (1975) J. Cell. Biol. 67, 852-862]. Signalpeptidase spalter normalt i carboxylsyresiden av rester med små nøytrale sidekjer, slik som glycin, alanin og serin [von Heijne, (1984) J. Mol. Biol. 173, 243-251]. Således kan alaninet (ala) i aminoendesiden av valinet (val) betegnet

nr. 1, utgjøre enderesten i signalpeptidet.

Avlesningsrammen vist i figur 22, er den eneste uten multiple termineringskodoner og koder for 383 rester etterfulgt av et TGA stoppkodon. Fjerning av det antatte signalpeptid ved spalting mellom alanin i posisjon -1 og valinet betegnet som nr. 1, resulterer i en fullt ferdig beta-PAI som er 379 rester lang og har en beregnet molekylvekt for carbohydratfritt molekyl på 42.770 dalton. Denne beregning stemmer godt med molekylvekten til den ikke-glycosylerte form av BAE-beta-PAI, som bestemt ved hjelp av in vitro translasjon av dens mRNA [Sawdey et al. (1986) *Thromb. Res.* 41, 151-160]. Human beta-PAI glycosyleres [van Mourik et al., (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 14914-14921], og aminosyre-restsekvensen i figur 22 inneholder 3 antatte glycosyleringssteder som stemmer overens med den anerkjente asn-x-ser/thr-sekvens [Marshall (1974) *Biochem. Soc. Symp.* 40, 17-26] i posisjonene 209-211, 265-267 og 329-331.

Det 3'-ikke-translaterte område i den 3,0 kb store cDNA er 1788 basepar (bp), eksklusiv poly (A)-området. Konsensus-polyadenyleringssekvensen AATAAA finnes 16 bp oppstrøms fra poly (A)-bindingssetet, noe som er i overensstemmelse med tidligere rapporter om at denne sekvensen vanligvis er lokalisert 15-25 nucleotider oppstrøms fra polyadenyleringssteder [Proudfoot, (1976) *Nature (London)*, 263, 211-214].

De to klonene som bærer cDNA-innskudd på 1,9 kb, ble delvis sekvensbestemt og synes å være identiske. Disse klonene er også identiske med den 3,0 kb store cDNA bortsett fra at de er avkortet og mangler mye av det 3'-ikke-translaterte område (dvs. de mangler området 3' fra nucleotid 1960).

"Northern blot"-analyse av total RNA fremstilt fra den humane fibrosarcomcellelinje HT 1080 (ATCC CCL 121) under anvendelse av den 3,0 kb store cDNA som probe, indikerte tilstedeværelse av to distinkte transkripter, 3,0 og 2,2 kilobaser i lengde (figur 23). Denne observasjon antyder at de 1,9 kb store cDNA-er kan ha blitt kopiert fra

det korteste RNA-transkript. En lignende størrelse-heterogenisitet i 3'-endene i mRNA-er er blitt iaktatt i andre systemer. Det kan skrive seg fra ekspresjon av mer enn ett gen, fra alternative sammenføyningshendelser, eller fra
5 bruken av multiple polyadenyleringssignaler [Crabtree et al., (1982) Cell 31, 159-166; King et al., (1983) Cell 32, 707-712; Hickok et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 594-598]. Mekanismen i dette tilfelle er ikke klar.

Selv om det eneste polyadenylerings-konsensussignal
10 (AATAAA) som finnes i denne cDNA-sekvens, er i 3'-enden av den 3,0 kb store cDNA (figur 22), ble en lignende, men litt modifisert sekvens (AATAAT) funnet i nucleotidposisjonene 1998-2003. Dersom denne sekvensen ble brukt som et signal for poly (A)-addisjon, kunne det forklare tilstedeværelsen
15 av det korteste transkript. I andre systemer er polyadenylering funnet å finne sted i fravær av AATAAA-sekvensen [Ohkubo et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 2196-2200].

Sammenligning av den utledede aminosyresekvens med
20 andre proteiner under anvendelse av Fast Protein Analysis homologiprogrammet [Lipman et al. (1985) Science 227, 1435-1441] avslørte at beta-PAI var 25-30% homolog med anti-trombin III (AT III), alfa₁-antitrypsin (alfa₁AT), alfa₁-antichymotrypsinogen og ovalbumin, og derfor er et medlem
25 av serinproteinaseinhibitor-overfamilien av proteiner (serpiner). Serpinene har fjernet seg fra et forfedre-molekyl over et tidsrom på 500 millioner år [Carrell et al., (1985) Trends Biochem. Sci. 10, 20-24] og utgjør nå en uensartet gruppe av beslektede proteiner som kontrollerer
30 de viktigste proteolyttiske kaskader i kroppen (f.eks. koagulerings-, komplement-, fibrinolyse- og betennelses-kaskadene).

Inhiberingsspesifisiteten til serpinene synes å
være definert primært av en enkel aminosyrerest i det reaktive senter, den såkalte P₁-rest [Carrell et al., (1985) Trends Biochem. Sci. 10, 20-24]. Vanligvis reflekterer
35 denne aminosyrerest den kjente spesifisitet til målprotein-

asen. Det reaktive senter i serpinene befinner seg nært carboxylenden, og ettersom det synes å stikke frem fra resten av molekylet [Carrell et al., (1985) Trends Biochem. Sci. 10, 20-24], kan det utgjøre det ideelle substrat eller "agn" for proteasen.

Proteaseinhibering er forbundet med dannelsen av 1:1-komplekser mellom inhibitor og enzym. Aminosyrerest-sekvensene i de reaktive sentre til beta-PAI, alfa₁AT og AT III er stilt opp ved siden av hverandre i figur 24 under anvendelse av en-bokstavs aminosyrerestbetegnelser.

I denne oppstilling er R (arg)-resten i posisjon 346 P₁-resten i PAI. Plasminogenaktivatorer omdanner plasminogen til plasmin ved spalting av en enkel arg-val-binding [Collen, (1980) Thromb. Haemostasis 43, 77-89]. Denne oppstilling er således i overensstemmelse med den kjente arg-spesifisitet til PA-er. Det funn at P₁₇-resten er glutaminsyre (E), understøtter også denne oppstilling, ettersom denne glutaminsyre virker som "hengslet" i serpiner og er bevart i alle serpiner som er sekvensbestemt hittil [Carrell et al., (1985) Trends Biochem. Sci. 10, 20-24].

Human beta-PAI er uvanlig følsom for oxydanter og taper hurtig sin aktivitet i nærvær av lave konsentrasjoner av kloramin T. Ettersom det ikke er noen cysteiner i den utledede proteinsekvens (figur 22), og ettersom aktiviteten av den oxydativt inaktiverte beta-PAI kan gjenopprettes ved behandling med methioninsulfoxyd-peptidreduktase, synes tapet av aktivitet å reflektere oxydasjonen av et avgjørende methionin. Methioninet i det reaktive senter til beta-PAI (dvs. i posisjon 347, den utledede P₁'-posisjon) er en sannsynlig kandidat ettersom alfa₁AT også er følsom for oxydasjon, og dens tap av aktivitet er blitt henført til oxydasjon av P₁-methioninet [Carrell et al., (1985) Trends Biochem. Sci. 10, 20-24]. I begge tilfeller er det resulterende methioninsulfoxyd en mer voluminøs rest og kan ikke lett passe inn i lommen i sin substratproteinase.

Det er blitt antatt at evnen til selektivt å inaktivere alfa₁AT ved oxydasjon av methionin i det aktive

sete er et viktig og unikt reguleringstrekk i dette systemet. Aktiverte neutrofiler kan nøytralisere inhibatoren ved utskillelse av oxygenfrie radikaler [Carrell et al., (1985) Trends Biochem. Sci. 10, 20-24] på betennelsessteder. Dette ytterligere reguleringsnivå kan gi midlet hvorved vesentlig vevnedbrytning kan finne sted, selv i nærvær av inhibitorer som normalt inhiberer neutrofil elastase. Forhøyet PA-aktivitet er blitt korrelert med vevdestruksjon, vevremodellering og med dannelse av nye organer [for oversikt, se Dano et al., (1985) Adv. Cancer Res. 44, 139-266]. Evnen til oxydativt å inaktivere den beta-PAI som er til stede i disse vevene, kan også være et viktig reguleringstrekk i disse systemer, som gjør det mulig for PA-er å virke i nærvær av sin inhibitor. Den lokale generering av oxydanter kan således inaktivere både alfa₁-AT og beta-PAI, og i prosessen slippe løs en kaskade av proteolytiske enzymer, deriblant elastase, plasmin og kollagenase [Moscattelli et al., (1980) i Proteases and Tumor Invasion, red. P. Struli (Raven Press, New York) s. 143-152].

III. MATERIALER OG METODER

A. I sammenheng med analyse

1. Plasminogenaktivator

Plasminogenaktivator av vevtype (t-PA) ble isolert fra medier kondisjonert med human melanomcelle, slik som beskrevet i Rijken et al., J. Biol. Chem., 256, 7035 (1981). I korte trekk ble humane melanomceller dyrket til sammenflytende monolag i vevkulturkolber av plast ved 37°C i atmosfæreluft supplert med 6% CO₂. Dyrkningsmediet besto av 100 ml modifisert "Eagle's essential medium" supplert med natriumbicarbonat (16 ml av en 7,5% oppløsning pr. liter medium), L-glutamin (10 ml av en 200 mM oppløsning pr. liter medium), og varmeinaktivert serum fra nyfødt kalv (sluttkonsentrasjon, 10%). Cellene ble vasket med medium uten kalveserum og inkubert med 25 ml serumfritt medium. Det resulterende, kondisjonerte medium (CM) ble høstet og skiftet ut 3 dager på rad, sentrifugert ved 7000 x g i 30 minutter og lagret ved -20°C inntil bruk. Når det er an-

gitt, ble aprotinin tilsatt både til det serumholdige og til det serumfrie medium (20 KIU/ml sluttkonsentrasjon).

Kommersielt tilgjengelig urokinase (5×10^5 CTA-enheter av WINKINASE) ble ytterligere rensset ved affinitets-
5 kromatografi som beskrevet i Holmberg et al., Biochim. Biophys. Acta, 445, 215 (1976).

2. Plasminogenaktivatorinhibitor

Bovine aorta-endotelceller (BAE-er) anvendt til rensingen av inhibitoren, ble isolert fra aorta hos kuer
10 ved hjelp av metoden til Booyse et al., Thromb. Diathes. Haemorrh., 34, 825 (1975), og dyrket i 150 cm^2 kolber i 15 ml modifisert Eagle's medium supplert med 10% kalvefoster-serum som beskrevet i Levin et al., Thromb. Res., 15, 869 (1979). Cellene for undersøkelsene var blitt overført
15 16-22 ganger ved et forhold på 1:5, og hadde generelt vært sammenflytende i minst én uke før fremstillingen av kondisjonerte medier (CM) som beskrevet nedenunder.

Klonene BAE-er ble anvendt til noen av de metabolske merkingsundersøkelser. Disse klonene ble utviklet fra
20 enkle celler som vokste frem fra et primært cellepreparat. I korte trekk ble nyisolerte celler inokulert i 60 mm skåler og fikk feste seg over natten. Cellene ble vasket med forvarmet medium, frigjort fra dyrkningsplaten med trypsin, dispergert forsiktig med en pipette og fortynnet til omtrent
25 20 celler pr. ml i dyrkningsmedium. Fire til fem aliquoter (50 mikroliter hver) av de fortynnede celler ble så plassert på den omsnudde, sterile underside av Cooper skållokk og inkubert i 60 minutter ved værelsetemperatur for å
muliggjøre cellefesting.

30 Etter at posisjonen til hver av celledråpene var avmerket med en penn, ble lokkene snudd tilbake på Cooper skålbunner inneholdende sammenflytende BAE-er i 6,7 ml dyrkningsmedium. De sammenflytende BAE-er var blitt oppbevart i dette medium i 24 timer, formodentlig under opparbeidelse
35 av vekstfaktorer, Gajdusek et al., J. Cell Biol., 85, 467 (1980). De avmerkede områder ble undersøkt i mikroskopet, og de områdene som inneholdt enkle celler, ble overvåket

etterfølgende dager med hensyn på cellevekst. Når disse klonene hadde vokst til noen få tusen celler, ble cellene fjernet ved ringkloning i nærvær av trypsin, fordelt i 0,5 cm mikrotiterbrønner inneholdende 100 mikroliter dyrkningsmedium og fikk vokse til sammenflytning. Tomme lokk ble også snudd om på Cooper skålbunner inneholdende sammenflytende BAE-er og tjente som kontroller for denne fremgangsmåten. Disse lokkene forble fri for celler gjennom inkubasjonsperioden, noe som indikerer at celler fra bunner ikke løsrives og festes på nytt på lokkene. Klonene utviklet ved hjelp av denne fremgangsmåte, var positive med hensyn på faktor VIII-beslektet antigen, noe som indikerer at de besto av endotelceller, Jaffe et al., J. Clin. Invest., 52, 2757 (1973).

Sammenflytende monolag ble så vasket to ganger med 15 ml PBS og deretter inkubert med 15 ml serumfritt medium. Etter 24 timer ble de resulterende CM samlet opp, slått sammen, sentrifugert i 5 minutter ved 400 x g, og etter tilsetning av NaN_3 og "Tween" 80 til konsentrasjoner på hhv. 0,02 og 0,01%, lagret ved -30°C inntil videre bruk. Omtrent 1 liter av CM ble sendt over en 10 ml concanavalin A-"Sepharose"-kolonne (1,5 x 5 cm) som tidligere var blitt ekvilibrert med fosfatbufret saltoppløsning (PBS) inneholdende 0,02% NaN_3 og 0,01% "Tween" 80 [polyoxyetylen(80)-sorbitan-monooleat] ved en hastighet på 10 ml/time ved 4°C .

Etter at det gjennomstrømmende materiale var samlet opp, ble kolonnen vasket med minst 10 kolonnevolumer PBS inneholdende 1M NaCl, 0,01% "Tween" 80 og 0,02% NaN_3 (pH 7,4) for å fjerne ikke-spesifikt adsorberte proteiner. Kolonnen ble vasket med omtrent det samme volum av denne buffer, men uten den tilsatte NaCl, og deretter eluert i 2 trinn. I det første trinn ble protein eluert med 0,01M natriumfosfat, pH 7,2, inneholdende 0,5M alfa-metyl-D-mannosid, 0,02% NaN_3 og 0,01% "Tween" 80 ved en hastighet på 2,5 ml/time. Kolonnen ble eluert en andre gang med den samme buffer, men inneholdende 1M NaCl.

Det andre trinn i rensingen omfattet preparativ SDS-PAGE. De inhibitorholdige fraksjoner (identifisert ved hjelp av plategelelektroforese og omvendt fibrinautografi) ble slått sammen, og aliquoter (225 mikroliter) ble under-
5 kastet SDS-PAGE i rørgeler. Etter at det målsøkende fargestoff hadde nådd bunnen i gelen, ble gelene nedfrost og kuttet i 1 mm skiver. Annenhver skive ble blandet og ekstrahert i 24 timer ved 4°C med 0,2 ml PBS inneholdende 0,01% "Tween". Hvert ekstrakt ble så testet med hensyn på inhi-
10 boraktivitet ved hjelp av ¹²⁵I-fibrinplateprøven (beskrevet nedenunder). Fraksjonene som inneholdt toppen av inhibitoraktivitet, ble slått sammen og lagret ved -70°C inntil videre bruk.

Inhibitoren ble også rensset fra CM samlet inn fra
15 celler dyrket i nærvær av L[3,4,5-³H]-leucin. I dette tilfelle ble kulturene vasket to ganger med 15 ml leucinfri MEM og ble deretter inkubert i nærvær av 15 ml leucinfri MEM inneholdende 20 mikroCi/ml L[3,4,5-³H]-leucin
(158 Ci/mmol). Etter 24 timer ble mediene samlet opp som be-
20 skrevet ovenfor, blandet med 55 ml umerket CM og sendt over en 1 ml concanavalin A-"Sepharose"-kolonne (0,6 x 3,5 cm) ved en hastighet på 4 ml/time. Kolonnen ble vasket og eluert ved 1 ml/time. På nytt ble de inhibitorholdige fraksjoner slått sammen og underkastet preparativ rørgelelektroforese.
25 Den resulterende inhibitor som inneholdt gel-ekstrakter, ble lagret ved -70°C inntil videre bruk.

Polyklonale reseptorer mot den rensede inhibitor ble fremkalt i kaniner som beskrevet nærmere nedenunder. Protein A-"Sepharose" CL-4B ble rehydratisert i PBS inne-
30 holdende 0,02% NaN₃, 0,05% "Tween" 20 [polyoxyetylen(20)-sorbitan-monolaurat] og 0,1% bovint serumalbumin, og vasket 3 ganger med et ti-gangers overskudd av denne buffer. IgG-fraksjonen i antiseraene ble koblet til de vaskede kuler som nærmere angitt av produsenten ved et forhold på omtrent
35 80 mikrogram protein A-"Sepharose" pr. 40 mikroliter av enten anti-inhibitorreagens eller pre-immunserum. De IgG-belagte kuler ble tilsatt til 1 ml CM samlet opp fra klonede

BAE-er dyrket i nærvær av [3,4,5-³H]-leucin. Prøvene ble inkubert i 1 time ved værelsetemperatur, kulene ble vasket ved sentrifugering (3 ganger med 1 ml PBS-"Tween" buffer) og ekstrahert i 1 time ved 37°C med 0,25M Tris-HCl (pH 6,8) inneholdende 2,2% SDS, 20% glycerol, 0,025% bromfenolblått og 2,5% (volum/volum) 2-mercaptoethanol. Den resulterende supernatant ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE i plategeler eller ved væskescintillasjonstelling.

SDS-PAGE i plategeler (15 x 10 x 0,15 cm) og rørgeler (10 x 0,5 cm) ble så utført i henhold til Laemmli, Nature (Lond.), 227, 680 (1970). Stabelgelen besto av 4% polyacrylamid og separasjonsgelen av 9% polyacrylamid (begge geler hadde en kryssbinding på 3%). Plategeler bestående av en 7,5-20% polyacrylamidgradient i separasjonsgelen ble også fremstilt. Etter elektroforese ble gelene fiksert og farget enten med 50% trikloreddiksyre inneholdende 1% Coomassie Brilliant Blue, eller med perjodsyre Schiff-reagens, som i Ginsburg et al., i Methods in Hematology, Harker et al., red., vol. 8, s. 158-176, Churchill Livingstone, New York (1983).

Molekylvektstandarder som ble anvendt for å bestemme den tilsynelatende molekylvekt til den rensede inhibitor, omfatter fosforylase B (92.500), humanplasminogen (90.000), transferrin (77.000), bovint serumalbumin (66.200), human-serumalbumin (66.000), ovalbumin (43.500), karbonsyre-anhydrase (31.000), sojabønne-trypsininhibitor (21.500), lysozym (14.400) og 66.000, 52.300 og 46.500 underenheter av humanfibrinogen.

For å lokalisere radioaktivt merkede proteiner ble de fargede plategeler tørket og bearbeidet for autoradiografi som beskrevet i Bonner et al., Eur. J. Biochem., 46, 83 (1974). Posisjonene til det radioaktivt merkede protein i rørgeler ble bestemt ved å skjære gelene i 1 mm stykker, ekstrahere hver gelskive i buffer som beskrevet ovenfor, og bestemme radioaktiviteten i hver fraksjon.

Alkalisk (SDS-fri), kontinuerlig PAGE ble utført som i Hjerten et al., Anal. Biochem., 11, 219 (1965), under

anvendelse av 0,37M Tris-glycin (pH 9,5) både som gel- og rennende buffer. Rørgeler var 10% polyacrylamid med en kryssbinding på 2,5%. Prøver ble brakt til 40% sucrose, tilført til gelen og underkastet elektroforese, først i
5 0,5 time ved 2,5 mA/cm² og deretter i 1-1,5 time ved 5 mA/cm².

Geler for isoelektrisk fokusering ble fremstilt i glassrør (2,5 mm) som i O'Farrell, J. Biol. Chem., 250, 4007 (1975). Den resulterende pH-gradient ble bestemt ved å kutte gelene i 1 mm skiver. Annenhver skive ble blandet og
10 ekstrahert i 0,2 ml H₂O i 18 timer ved 4°C, og pH og radioaktivitet i hvert av disse ekstraktene ble bestemt. Skiver fra parallelle geler ble også ekstrahert i 0,2 ml PBS/"Tween" og analysert med hensyn på inhibitoraktivitet og radioaktivitet.

15 Inhibitoraktivitet i polyacrylamidgeler ble lokalisert enten ved direkte måling av gelekstraktenes evne til å inhibere u-PA-mediert lyse av ¹²⁵I-fibrin [fibrinplate-metode ifølge Loskutoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 74, 3903 (1977)], eller ved omvendt fibrinautografi som i
20 Erickson et al., Anal. Biochem., 137, 454 (1984). I den sistnevnte teknikk skrev de hvite lyseresistente soner i indikatorfilmen seg fra tilstedeværelsen av inhibitorer i plategelen.

For å bestemme inhibitorens stabilitet under denaturerende betingelser ble det rensede molekul (20 mikrogram/ml) inkubert i 1 time ved 37°C i 0,02M glycin, pH 2,7, inneholdende 25 mikrogram/ml humant serumalbumin. Prøven ble
25 nøytralisert ved tilsetning av tre volumdeler analysebuffer (pH 8,1) og deretter testet ved forskjellige fortynninger laget i analysebuffer, med hensyn på restaktivitet ved hjelp
30 av ¹²⁵I-fibrinplatepøven. Inhibitor (20 mikrogram/ml) ble også inkubert i 1 time ved 37°C i PBS inneholdende 0,025% SDS og albumin (25 mikrogram/ml). SDS ble nøytralisert ved tilsetning av 3 volumdeler analysebuffer inneholdende 0,18%
35 "Triton" X-100 [polyoxyethylen(9)octylfenylether], og gjenværende inhibitoraktivitet ble målt. Prøver behandlet med PBS i stedet for glycin og SDS, tjente som kontroller for

disse undersøkelser. Virkningen av sur glycin og SDS på inhibitoraktiviteten til rensset protease-nexin (160 mikrogram/ml) ble bestemt på lignende måte.

3. Dannelse av polyklonale reseptorer

5 Antisera mot inhibitoren ble fremkalt i New Zealand-kaniner ved subkutane injeksjoner av 20 mikrogram rensset inhibitor oppløst i 1 ml saltoppløsning og emulgert med 1 ml Freund's komplette adjuvans. Forsterkningsinjeksjoner hvor det ble anvendt 10 mikrogram av rensset inhibitor i 0,5 ml
10 saltoppløsning og emulgert med en like stor mengde ukomplett Freund's adjuvans, ble administrert med 2 ukers intervaller. Serum inneholdende polyklonale reseptorer mot inhibitoren, ble samlet inn 10 dager etter den tredje og fjerde immunisering og slått sammen.

15 4. Inhibitorbinding til t-PA-prøve

Renset t-PA (50 mikroliter/brønn, 1 mikrogram/ml) i fosfatbufret saltoppløsning (PBS) ble inkubert over natten ved 4°C i ubundne mikrotiterplater (PVC-plast, Falcon 3911, Microtest III). På dette og ved hvert etterfølgende trinn
20 ble platene vasket med SPRIA-buffer (supplert med 0,1% BSA, 0,05% NaN₃ og 0,05% "Tween" 20). For å "blokkere" eventuelle gjenværende seter på plasten, ble 3% BSA (200 mikroliter/brønn) inkubert i brønnene i 1 time ved 37°C. Testprøver og standardkurver av rensset inhibitor ble fremstilt
25 i fortynningsbuffer (PBS supplert med 3% BSA, 5 mM EDTA, 0,1% "Tween" 80 og 0,02% NaN₃), og 50 mikroliter/brønn ble inkubert i 1 time ved 37°C. Bundet inhibitor ble påvist ved inkubasjon i 2 timer ved 37°C med kanin-anti-inhibitor-reseptor (1:75 fortynning i fortynningsbuffer, 50 mikroliter/brønn). Det bundne antistoff-inhibitor-t-PA-kompleks
30 ble så kvantifisert ved inkubasjon i 2 timer ved 37°C med ¹²⁵I-merket geit-anti-kanin-IgG (5 x 10⁴ cpm/brønn). Brønnene ble kuttet individuelt og radioaktiviteten i hver brønn bestemt i en gammateller (CT (80-800) CT/T).

35 5. Forskjellig

Plasminogen ble rensset fra utdatert, humant plasma ved affinitetskromatografi på lysin-"Sepharose" som beskrevet i Deutsch et al., Science, 170, 1095 (1970). Protein ble

bestemt ved fremgangsmåten til Bradford, Anal. Biochem.,
12; 248 (1976) under anvendelse av bovint serumalbumin som
standard. PA-aktivitet ble analysert på ^{125}I -fibrin-
belagte, flerbrønners vevkulturskåler som beskrevet av
5 Loskutoff et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 74, 3903
(1977). Proteiner ble enzymatisk merket med ^{125}I under
anvendelse av lactoperoxydase/glucoseoxydase-reagenser i
fast tilstand og bærerfri $\text{Na } ^{125}\text{I}$, eller alternativt ved
hjelp av jod-gen-fremgangsmåten til Fraker et al., Biochem.
10 Biophys. Res. Commun., 80, 849 (1978), modifisert slik at
merkingsintervallet bare var 5 minutter, og temperaturen var
 4°C . En typisk spesifikk aktivitet for sluttproduktet var
 $1-4 \times 10^6$ cpm/mikrogram protein. Bovint fibrinogen (frak-
sjon II) ble renset som foreslått i Mosesson, Biochim.
15 Biophys. Acta, 57, 204 (1962) for å fjerne plasminogen.
Protease-nexin ble renset fra dyrkede humane fibroblastere
som i Scott et al., J. Biol. Chem., 258, 10439 (1983) og
vennligst tilveiebrakt av dr. J. Baker, University of Kansas,
Lawrence, KS. ^{125}I -plasminogen-spaltingsprøven ble utført
20 som beskrevet i Loskutoff et al., J. Biol. Chem., 256, 4142
(1981) og Mussoni et al., Thromb. Res., 34, 241 (1984).

B. I sammenheng med beta-PAI

1. Reagenser

Restriksjonsenzymer, alkalisk fosfatase, T4-DNA-
25 ligase, E. coli DNA-polymerase I, Klenow-fragment av DNA-
polymerase I og T4-DNA-polymerase ble innkjøpt. Alfa-
 ^{32}P dGTP (3000 Ci/mmol) og ^{35}S dATP-alfa-S (600 Ci/mmol;
1 Ci = 37 GBq) ble innkjøpt. Humant alfa-trombin var en
generøs gave fra J. Fenton (Albany, New York, NY), mens
30 fibrinogen ble innkjøpt. Den rensede, humane urokinase
[W.H.O. Urokinase Standard (preparat 66-46)] ble erholdt
fra National Institute for Biological Standards and Control,
Hollyhill, Hampstead, London, Storbritannia. Humant
plasminogen ble erholdt og renset i henhold til fremgangs-
35 måten ifølge Deutsch et al., (1970) Science, 170, 1095-1096.
Rensingen av BAE-beta-PAI og fremkallingen av antistoffer
mot den var som beskrevet av van Mourik et al., (1984)

J. Biol. Chem., 259, 14914-14921. Antiserum mot morkake-PAI var en gave fra dr. James Wun, The Rockefeller University, New York, NY. Fag λ gt₁₁ er tilgjengelig fra ATCC som ATCC 37194.

5 2. Fremstilling og analyse av
 urenset morkakeekstrakt

Nedfryst menneskemorkake (3,5 g) ble vasket med PBS og ekstrahert i 15 ml PBS inneholdende 0,5% "Triton" X-100 [polyoxyethylen(9)octyl-fenylether] ved 4°C. Vevet ble
10 homogenisert under anvendelse av en Dounce-homogenisator, og cellerester ble fjernet ved sentrifugering med 10.000 x g i 10 minutter. Ekstraktene ble analysert med hensyn på inhibitoraktivitet ved omvent fibrinautografi [Erickson et al., (1984) Analytical Biochemistry, 137, 454-463]. Mono-
15 spesifikke antisera mot PAI av human morkaketype og bovin beta-PAI ble koblet til protein A "Sepharose" og anvendt som beskrevet [van Mourik et al., (1984) J. Biol. Chem., 259, 14914-14921; Sawdey et al. (1986) Thromb. Res., 41, 151-160] til å immunutfelle PAI-ene som er til stede i ekstraktet.

20 3. Immunologisk screening av en
 gt₁₁ cDNA-samling

En human λ gt₁₁ cDNA-samling utvunnet fra en ikke fullt utviklet (34 uker gammel) menneskemorkake og bestående av 1×10^6 uavhengige, rekombinante fager [Millan, (1986)
25 J. Biol. Chem. 261, 3112-3115] ble gjennom søkt immunologisk [Young et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1194-1198; Young et al., (1983) Science, 222, 778-782; Huynh et al., (1984) i DNA Cloning Techniques: A Practical Approach, red. Glover, D. (IRL Press, Oxford)] for beta-PAI,
30 under anvendelse av den affinitetsrensede IgG-fraksjon [Cuatrecasas (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 531-537] av antistoffer mot den rensede BAE-beta-PAI som antistoffprobe [van Mourik et al., (1984) J. Biol. Chem. 259, 14914-14921]. For å visualisere antistoffbinding ble
35 det anvendt ¹²⁵I-merket protein A [55 milliCurie pr. milli-gram (mCi/mg)]. Autoradiografi ble utført ved å eksponere filtrene mot Kodak XAR5-film med en forsterkningsskjerm ved -80°C.

4. "Western blot"-analyse av E. coli-lysater

Lamda gt_{11} og rekombinante lysogener ble indusert, og r ekstrakter av infisert E. coli ble fremstilt som beskrevet i [Huynh et al., (1984) i DNA Cloning Techniques: A Practical Approach, red. Glover, D. (IRL Press, Oxford)]. For "Western blot"-analyse av den uttrykte PAI ble 50 mikroliter (μ l) av r ekstraktet fraksjonert ved hjelp av SDS-PAGE [Laemmli, (1970) Nature (London) 227, 680-685]. Proteinene ble elektroforetisk overført til nitrocellulosepapir og immunoblottet som beskrevet i [Lammle et al., (1986) Thromb. Res. 41, 747-759; Johnson et al., (1984) Gene Anal. Techn. 1, 3-8], under anvendelse av immunoglobulinfraksjonen av antiserum rens t enten på beta-PAI-affinitetskolonner (ovenfor) eller på det isolerte, i det vesentlige rene fusjonspolypeptid.

For affinitetsrensingen av antisera på det isolerte, i det vesentlige rene fusjonspolypeptid ble 900 μ l r ekstrakt fra induserte E. coli-lysogener [Huynh et al., (1984) i DNA Cloning Techniques: A Practical Approach, red. Glover, D. (IRL Press, Oxford)] fraksjonert ved hjelp av SDS-PAGE og overført til nitrocellulosepapir. Strimler inneholdende proteinlignende materialer med M_r 150-200 kilodalton (kda) ble skåret ut fra nitrocellulose arkene og brukt til affinitetsrensingen av antisera. Blokkering av nitrocellulosefilterstrimlene, binding av spesifikke antistoffer og vaskinger ble utført som beskrevet for screeningen av λgt_{11} -samlinger med antistoffprober [Huynh et al. (1984) i DNA Cloning Techniques: A Practical Approach, red. Glover, D. (IRL Press, Oxford)]. For   eluere bundet antistoff ble filterstrimlene inkubert to ganger med 200 μ l 0,1 M glycine-HCl-buffer, pH 2,5, inneholdende 0,02% kalvefosterserum i 3 minutter. Det eluerte materiale ble nøytralisert ved tilsetning av 140 μ l 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0, dialysert over natten og brukt som det primære antistoff i "Western blotting"-analyse.

5. Nucleinsyremetode

(a) Kloning og sekvensering av PAI-gener

- Fagpartikler fremstilt ved hjelp av plate-lysatsmetoden og rensset ved hjelp av CsCl-likevektssentrifugering ble brukt for rensingen av fag-DNA [Maniatis et al., (1982) i Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY]. Plasmid-DNA ble isolert ved hjelp av metoden til Birnboim et al., (1979) Nucleic Acids Res. 7, 1513-1522, etterfulgt av to på hverandre følgende ethidiumbromid/CsCl-likevektssentrifugeringer. Enzymreaksjoner ble utført i overensstemmelse med betingelsene foreslått av leverandørene. Total RNA ble fremstilt ved hjelp av fremgangsmåten til Berger et al., (1979) Biochemistry 18, 5143-5149 fra dyrkede HT 1080 celler (ATCC CCl 121), fraksjonert ved hjelp av agarosegelelektroforese i nærvær av formaldehyd [Fellous et al., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79, 3082-3086] og underkastet "Northern blot"-analyse [Thomas, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77, 5201-5205].
- DNA fra λ gt₁₁-kloner ble oppløst med EcoRI-endonuclease, og det fjernede cDNA-innskudd ble underklonet i bakteriofag M13 kloningsvektor mp9 [Messing, (1982) Gene 19, 269-276] eller plasmidvektor pGEM-3. M13-kloner inneholdende cDNA-innskuddet i begge orienteringer, ble isolert og "deletion"-samlinger av begge molekyltrådene ble konstruert ved å bruke den en-trådede M13-metoden til Dale et al., (1985) Plasmid 13, 31-40. Før sekvensering ble størrelsen til M13-templatene bestemt ved elektroforese på 0,7% agarosegeler, og utvalgte templatere ble sekvensert ved hjelp av dideoxy-kjede-termineringsmetoden [Sanger et al., (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 5463-5487]. Begge DNA-trådene ble sekvensert, og over 80% av hver tråd ble sekvensert to eller flere ganger.
- Bearbeiding av DNA-sekvensdata ble utført ved å bruke Staden-programmet [Staden, (1982) Nucl. Acid. Res. 10, 4731-4751]. Homologiundersøkelser ble gjort ved å benytte Pearson Fast Protein homologyprogrammet [Lipman et al., (1985) Science 227, 1435-1441].

(b) Ekspresjon i eukaryoter

(i) Produksjon av PAI ved hjelp av rekombinant
DNA-ekspresjon i pattedyrceller

En rekombinant DNA-vektor som er i stand til å
5 uttrykke PAI-genet i pattedyr-marsvineggstokkceller (CHO),
ble konstruert på følgende måte ved å bruke fremgangsmåter
som er godt kjent innen teknikken og er beskrevet nærmere i
Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual,
Cold Spring Harbor Laboratories (1982).

10 Lambda 3 klon-DNA eller plasmid pPAI₃-DNA underkastes
først restriksjonsendonucleaseoppløsning med restriksjons-
endonuclease EcoRI, og det resulterende 3 kilobasepar (kb)
store fragment renses ved størrelsefraksjonering. 3'-
forsenkede ender i den 3 kb store restriksjonsendonuclease-
15 oppløste DNA ble fylt igjen ved å bruke Klenow-fragmentet av
DNA-polymerase I. Et syntetisk oligonucleotidfragment med
sekvensen:

GCATCGGATCCGATGC

fremstilles ifølge fremgangsmåtene til Caruthers et al.,
20 J. Am. Chem. Soc., 103:3185 (1981) og Gait et al., Cold
Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 47:393 (1983) og buttende-
ligeres til det igjenfylte 3 kb store fragment ved å bruke
T4 DNA-ligase. Det resulterende, ligerte fragment omfattende
det 3 kb store fragment og det syntetiske oligonucleotid,
25 underkastes videre BamHI-restriksjonsendonucleaseoppløsning.

Den apevirus-baserte (SV40) ekspresjonsvektor,
pKSV-10, underkastes BglII-restriksjonsendonucleaseoppløsning.
Det ovenfor fremstilte BamHI-oppløste fragment inneholdende
PAI-kodende sekvenser, blandes med den BglII-oppløste vektor
30 og ligeres under anvendelse av T4 DNA-ligase som resulterer i
dannelsen av et ringformet, rekombinant ekspresjonsplasmid
betegnet pSV-PAI.

Ekspresjonsplasmidet pSV-PAI inneholder et intakt
E. coli ampicillin-resistensgen. E. coli RR101 kan således,
35 når det er transformert med pSV-PAI, velges ut på basis av
ampicillinresistens for de bakterier som inneholder plas-
midet. Plasmidholdige bakterier klones så, og klonene

sorteres deretter med hensyn på den korrekte orientering av det innskutte PAI-kodende gen i ekspresjonsvektoren.

Screening med hensyn på orientering utføres ved å ta i betraktning lokaliseringen av PstI-restriksjonsendonucleasetene både på det innskutte gen og på ekspresjonsvektoren. I pSV-PAI genererer PstI-oppløsning fragmenter med ca. 3,9, 3,1, 3,0 og 0,5 kb dersom det PAI-holdige innskudd er 3' i forhold til SV40 transkripsjonspromoterens når man avleser fra venstre mot høyre slik som vist i figur 22, og genererer fragmenter med ca. 3,9, 3,5, 2,6 og 0,5 kb når innskuddet er i den motsatte orientering. Identifisering av pSV-PAI-konstruksjoner med den korrekte orientering krever derfor størrelseanalyse av fragmentene generert etter PstI-restriksjonsendonucleaseoppløsning, og utvelgelsen av de hvor fragmentene er ca. 3,9, 3,1, 3,0 og 0,5 kb. Konstruksjonene med innskuddet i den korrekte, tidligere nevnte orientering, velges ut for videre bruk i ekspresjon og refereres heretter til som pSV-PAI.

Det ovenfor erholdte plasmid, pSV-PAI, inneholdende genet som koder for PAI, formeres ved å dyrke E. coli som inneholder plasmidet. Plasmid-DNA isoleres fra E. coli-kulturer under anvendelse av fremgangsmåten med alkalisk lyse beskrevet i Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories (1982).

Ekspresjon av PAI utføres ved innføring av pSV-PAI i pattedyrcellelinjen, CHO, under anvendelse av den calciumfosfat-medierte transfeksjonsmetode til Graham et al., Virology, 52:456 (1973). For å sikre maksimal effektivitet i innføringen av pSV-PAI i alle CHO-celler i kultur, utføres transfeksjonen i nærvær av et andre plasmid, pSV2NEO (ATCC nr. 37149) og det cytotoksiske legemiddel G418 som beskrevet av Southern et al., J. Mol. Appl. Genet., 1:327 (1982). De CHO-celler som er resistente overfor G418, dyrkes og har ervervet i seg begge plasmidene, pSV2NEO og pSV-PAI, og betegnes CHO/pSV-PAI-celler. I kraft av den genetiske arkitektur i pSV-PAI-ekspresjonsvektoren uttrykkes PAI i de resulterende CHO/pSV-PAI-celler og kan påvises i

og renses fra cytoplasmaet til disse cellene.

Uttrykt PAI påvises lettvis ved hjelp av prøven med omvendt fibrinautografi (RFA) beskrevet tidligere. For dette formål dyrkes CHO/pSV-PAI-celler og lyses deretter i SDS-PAGE-prøvebuffer som beskrevet av Laemmli, Nature, 227:680 (1970). Den resulterende oppløsning inneholdende cellulært protein, sentrifugeres ved 15.000 rpm i 10 minutter, og supernatantene samles opp. Den resulterende supernatant underkastes SDS-polyacrylamidgelelektroforese, og biologisk aktiv PAI analyseres ved hjelp av RFA.

(ii) Produksjon av PAI ved rekombinant
DNA-ekspressjon i gjær

Den rekombinante vektor som er i stand til å uttrykke PAI-genet i gjæren *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), konstrueres på følgende måte ved å bruke fremgangsmåter henviset til i avsnitt III B5 (b) (i). Mange av trinnene er identiske med de som er brukt ovenfor, bortsett fra at det er nødvendig å tilpasse innsetting av PAI-genet i en gjærforenlig ekspressionsvektor og manipuleringen av gjærceller.

Etter isolering av 3 kb-fragmentet fra λ 3-klonen eller pPAI₃ og utfylling av de 3'-forsenkede ender, buttende-ligeres et likeledes fremstilt, syntetisk oligonucleotid med sekvensen:

GCATCGATGC

på det resulterende fragment. Gjærekspressionsvektoren, pTDT1 (ATCC nr. 31255), og det oligonucleotid-ligerte fragment oppløses begge ved ClaI-restriksjonsendonuclease, blandes og ligeres ytterligere sammen ved å bruke T4 DNA-ligase slik at det dannes et ringformet, rekombinant ekspressionsplasmid betegnet pY-PAI. Etter transformasjon av *E. coli* med det således fremstilte plasmid, følger utvelgelsen av ampicillinresistente, plasmidholdige bakterier slik som ovenfor, basert på ampicillin-resistensgenet som er til stede på pY-PAI.

Plasmidholdige bakterier kloner og utsorteres med hensyn på den korrekte orientering av det innskutte PAI-gen

ved i det vesentlige å følge fremgangsmåten angitt ovenfor. I pY-PAI genererer BamHI-restriksjonsendonucleaseoppløsning fragmenter med ca. 7,4 og 3,3 kb dersom det PAI-holdige innskudd er 3' i forhold til TRPl-gjærpromoteren i pTDT1
5 når man avleser fra venstre mot høyre som vist i figur 22. Konstruksjonen med innskuddet i den tidligere nevnte, korrekte orientering velges ut for videre bruk i ekspresjon, og henvises heretter til som pY-PAI.

10 Ekspresjon av PAI i gjær utføres ved transformasjon av stammen SHY3 *S. cerevisiae* (ATCC nr. 44771) under anvendelse av pY-PAI-plasmid-DNA formert og rensset som beskrevet tidligere. Etter transformasjon ved hjelp av sfæroplast-fremgangsmåten til Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:1929 (1978), dyrkes SHYU3-celler i
15 næringsseleksjonsmedium omfattende 0,67% gjærnitrogenbase uten aminosyrer, 2% glucose og 50 mikrogram pr. milliliter hver av adenin, leucin og uracil, som beskrevet av Miyajima et al., Mol. Cell Biol., 4:407 (1984). I kraft av den genetiske arkitektur i pY-PAI-ekspresjonsvektoren,
20 uttrykkes PAI i de resulterende pY-PAI-transformerte SHY3-celler, heretter kalt SHY3/pY-PAI-celler, og kan påvises i og renses fra cytoplasmaet fra disse cellene.

Uttrykt PAI påvises bekvemt ved hjelp av RFA-prøven som beskrevet tidligere. For dette formål dyrkes SHY3/pY-PAI-celler eksponensielt til en tetthet hvor den optiske
25 tetthet ved 600 nanometer (nm) (OD600) er lik med 1, og deretter vaskes gjærcellene med vann og oppslemmes i tre volumdeler av en oppløsning inneholdende 50 mM kaliumfosfat (pH 7,0), 1 mM ethylendiamin-tetraeddiksyre (EDTA),
30 5 mM 2-mercaptoethanol, 0,5 mM fenylmethylsulfonylfluorid og 1 mikrogram hver pr. milliliter av leupeptin og pepstatin. Gjærceller brytes deretter opp ved manuell rysting med glasskuler og sentrifugeres ved 12.000 rpm i 30 minutter i en "Sorval" SS34-sentrifuge. Supernatanten fra sentri-
35 fugeringen fortynnes 1:1 med en to ganger oppkonsentrert oppløsning av gjærceleproteiner som også inneholder SDS-PAGE-

prøvebufferen beskrevet tidligere. Denne oppløsning sentrifugeres og analyseres ved hjelp av RFA etter SDS-PAGE som også beskrevet.

5 I hver av de ovenfor nevnte illustrasjoner inneholder den resulterende uttrykte PAI hele aminosyrerestsekvensen og omfatter videre den følgende sekvens lokalisert i aminoavslutningsenden av den fullt ferdige PAI:

Met-Gln-Phe-Gly-Glu-Gly-Ser-Ala.

10 Det ovenfor nevnte er ment å være illustrerende for foreliggende oppfinnelse.

P a t e n t k r a v

15 1. Hovedsakelig ren, rekombinant humanendotelplasminogenaktivatorinhibitor, PAI-1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inhiberer aktivitetene til både t-PA og u-PA, er immunologisk forskjellig fra proteasenexin og morkakeplasminogenaktivatorinhibitor, og
20 inneholder aminosyresekvensen som tilsvarer aminosyrene 1-379 angitt i figur 22, eventuelt fusjonert til β -galaktosidase.

2. Hovedsakelig ren plasminogenaktivatorinhibitor ifølge
25 krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at inhibitoren er et fusjonspolypeptid som oppviser en tilsynelatende relativ molekylmasse på ca. 180 kilodalton i SDS-PAGE-analyse.

30 3. Hovedsakelig ren plasminogenaktivatorinhibitor ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at inhibitoren oppviser en tilsynelatende relativ molekylmasse på ca. 40 kilodalton i SDS-PAGE-analyse.

4. Biologisk rent DNA-molekyl som koder for endotel-plasminogenaktivatorinhibitoren PAI-1, karakterisert ved at det inneholder 1140 til 3000 nucleotider og omfatter en nucleotidsekvens som består hovedsakelig av den nucleotidsekvens som, fra venstre mot høyre og i retningen fra 5'-enden til 3'-enden, svarer til sekvensen som har formelen i figur 22 fra nucleotidposisjon 13 til posisjon 1153.

10 5. DNA-molekyl ifølge krav 4, karakterisert ved at det har nucleotidsekvensen som hovedsakelig består av den nucleotidsekvens som svarer til sekvensen i figur 22 fra nucleotidposisjon 1 til posisjon 1960.

15 6. DNA-molekyl ifølge krav 4, karakterisert ved at det har nucleotidsekvensen som hovedsakelig består av den nucleotidsekvens som svarer til sekvensen i figur 22 fra nucleotidposisjon 1 til
20 posisjon 1153.

7. Ikke-kromosomal ekspresjonsvektor som koder for og kan uttrykke et PAI-1-gen, karakterisert ved at vektoren inneholder et
25 egnet replikasjonsorigo, en seleksjonsmarkørkodende sekvens og DNA-sekvensen ifølge kravene 4-6 i kombinasjon med transkripsjons- og translasjonsregulerende sekvenser som muliggjør ekspresjon i en egnet vertscelle.

30

35

FIG. 1

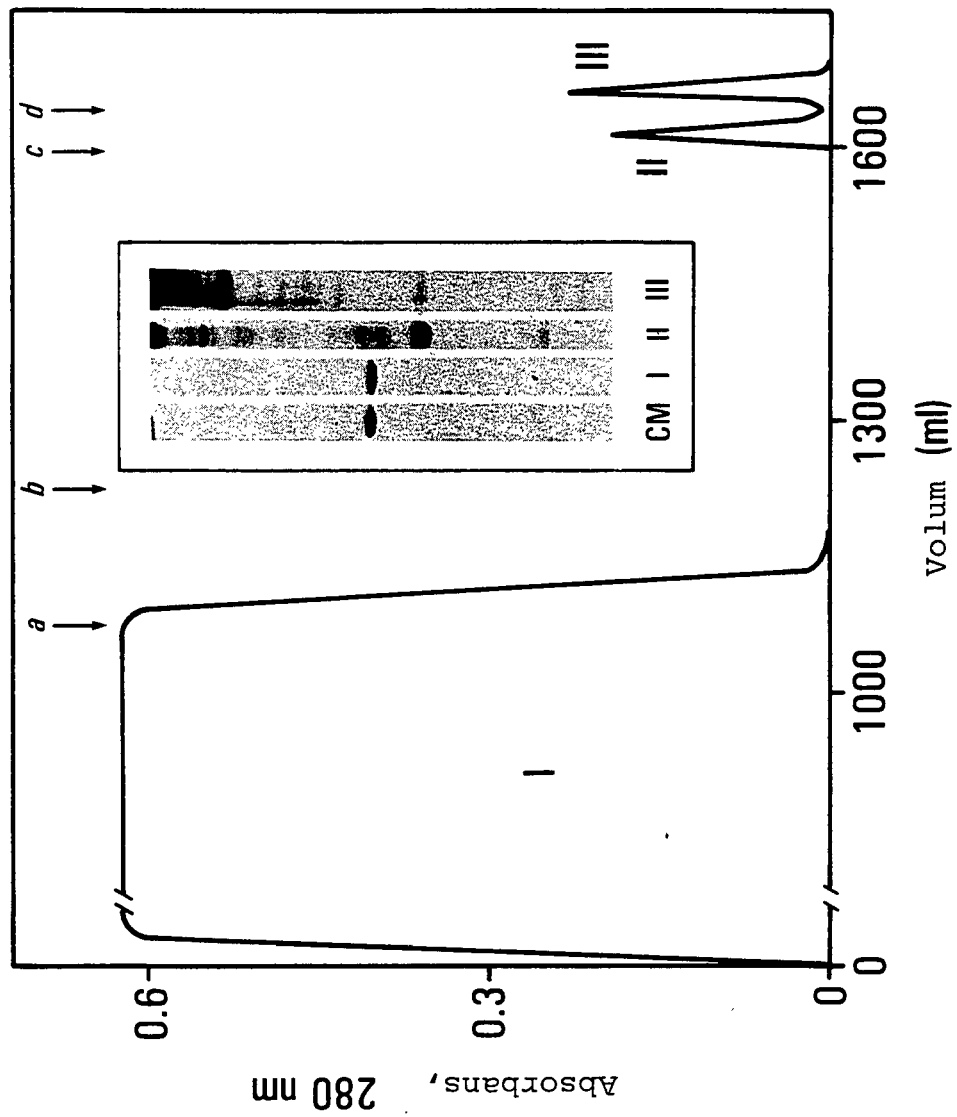


FIG. 2

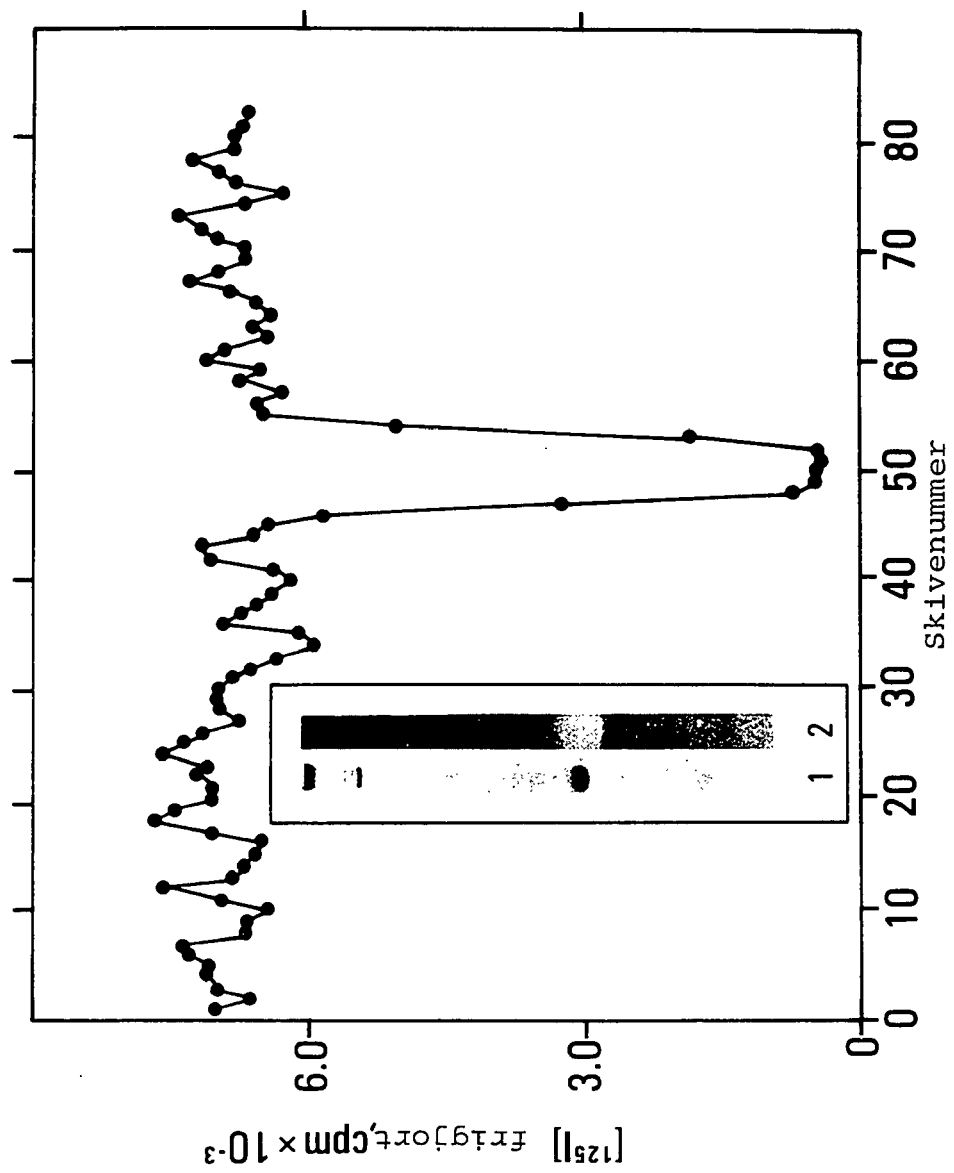
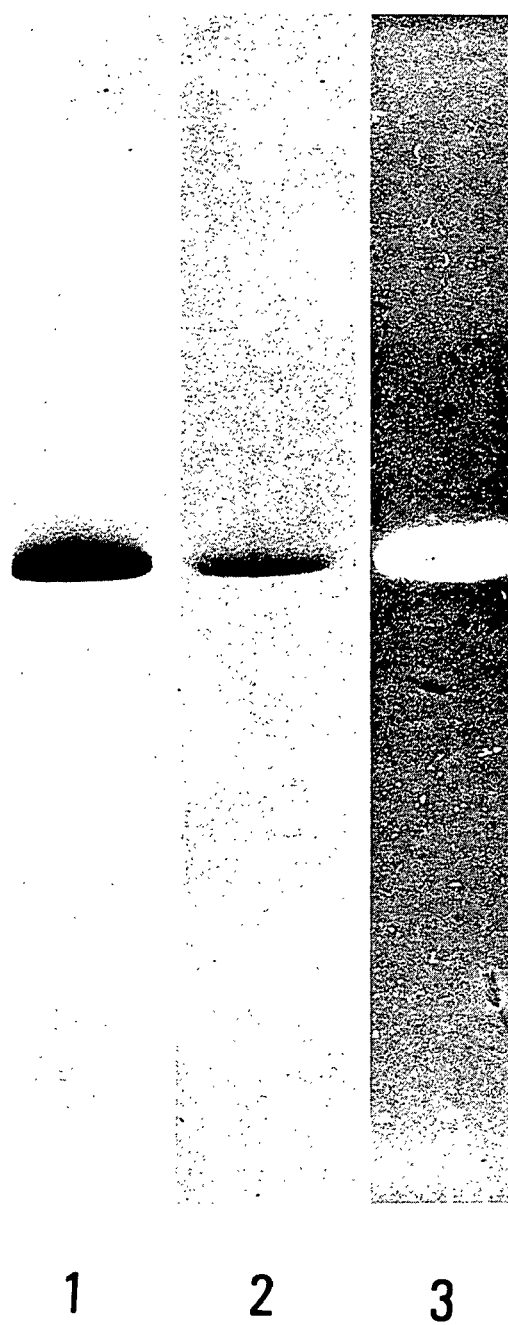


FIG. 3

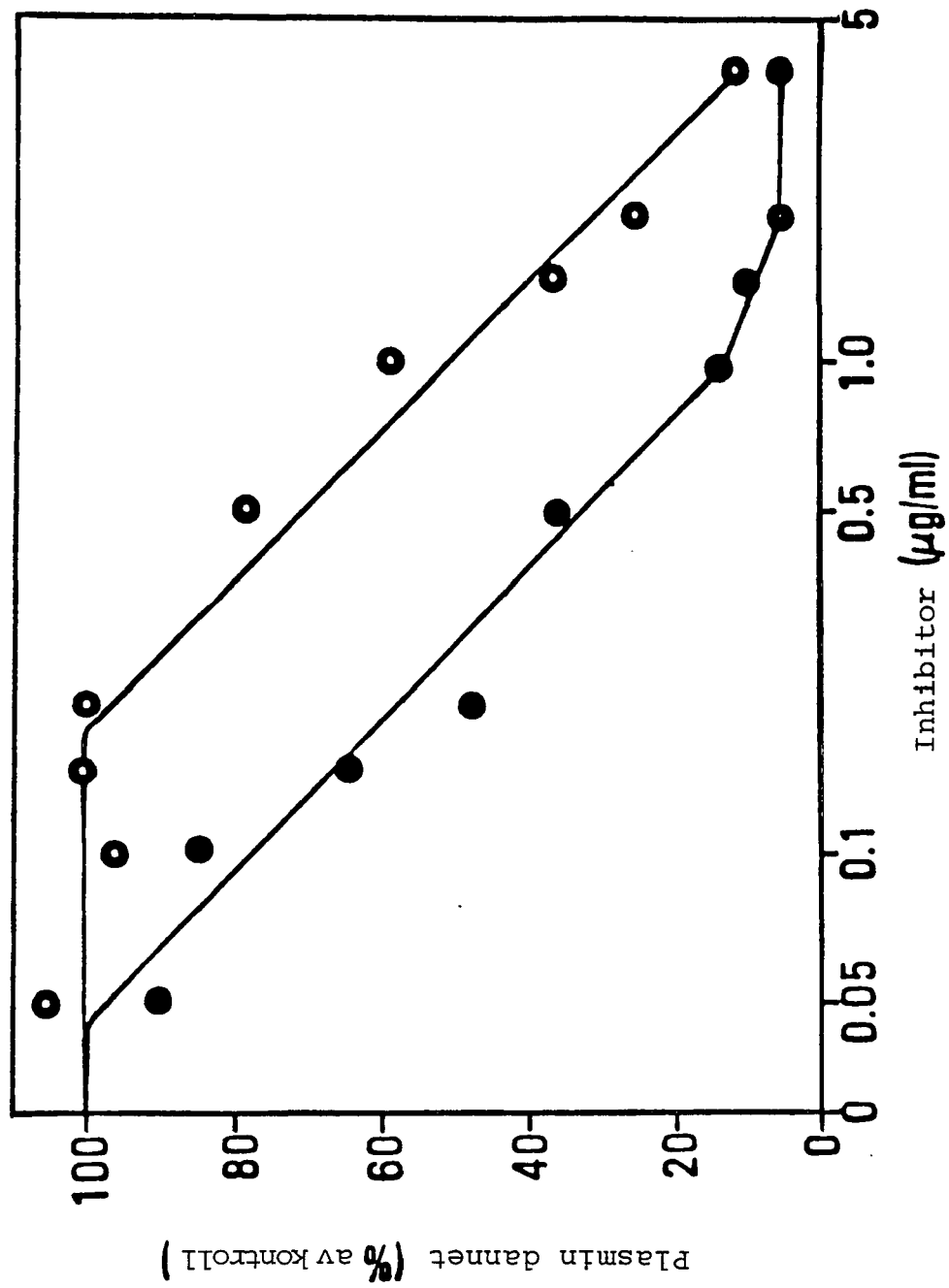


FIG. 4

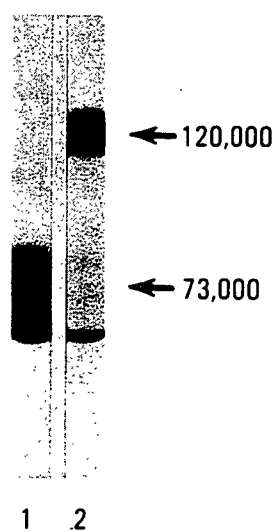
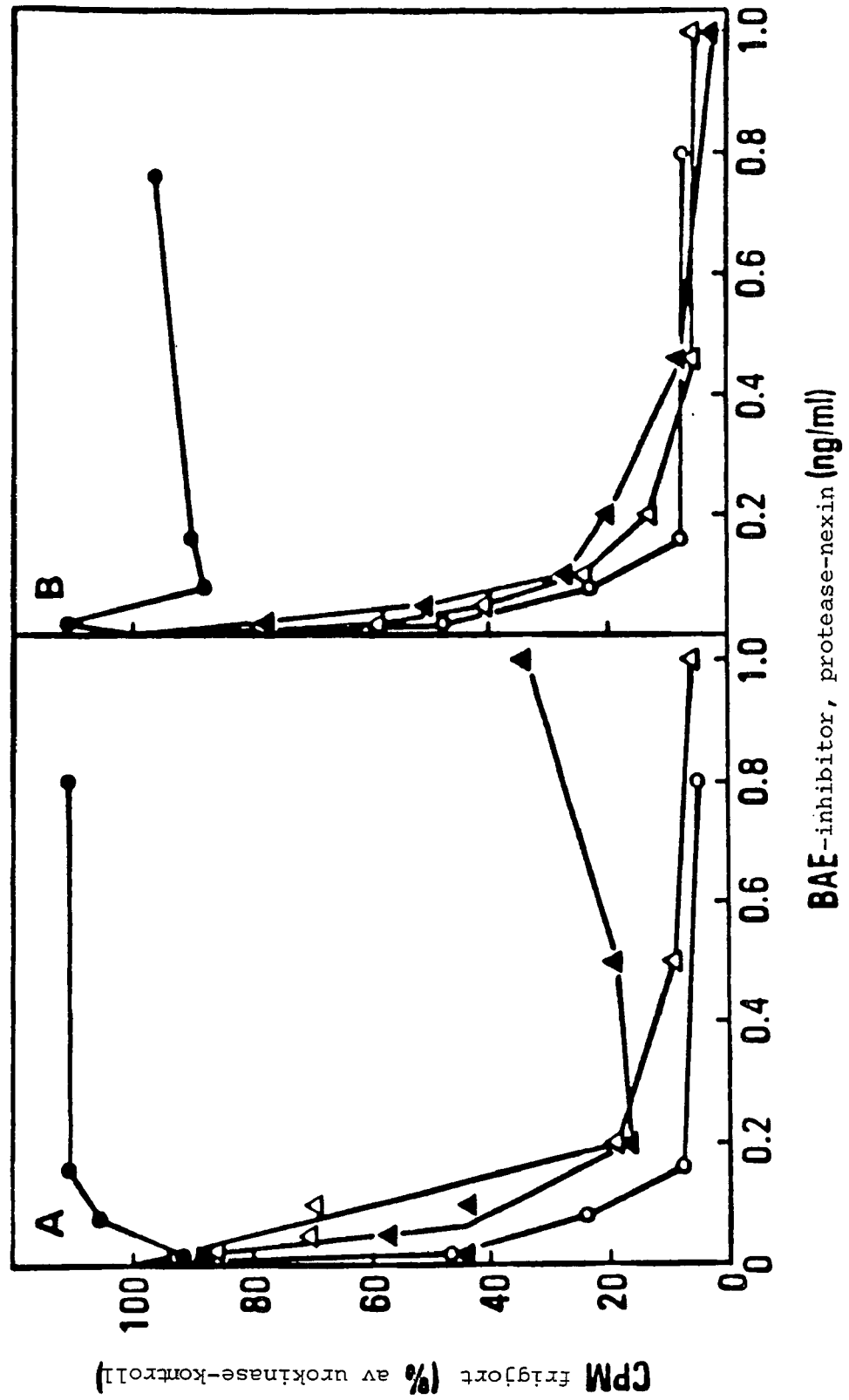
FIG. 5

FIG. 6



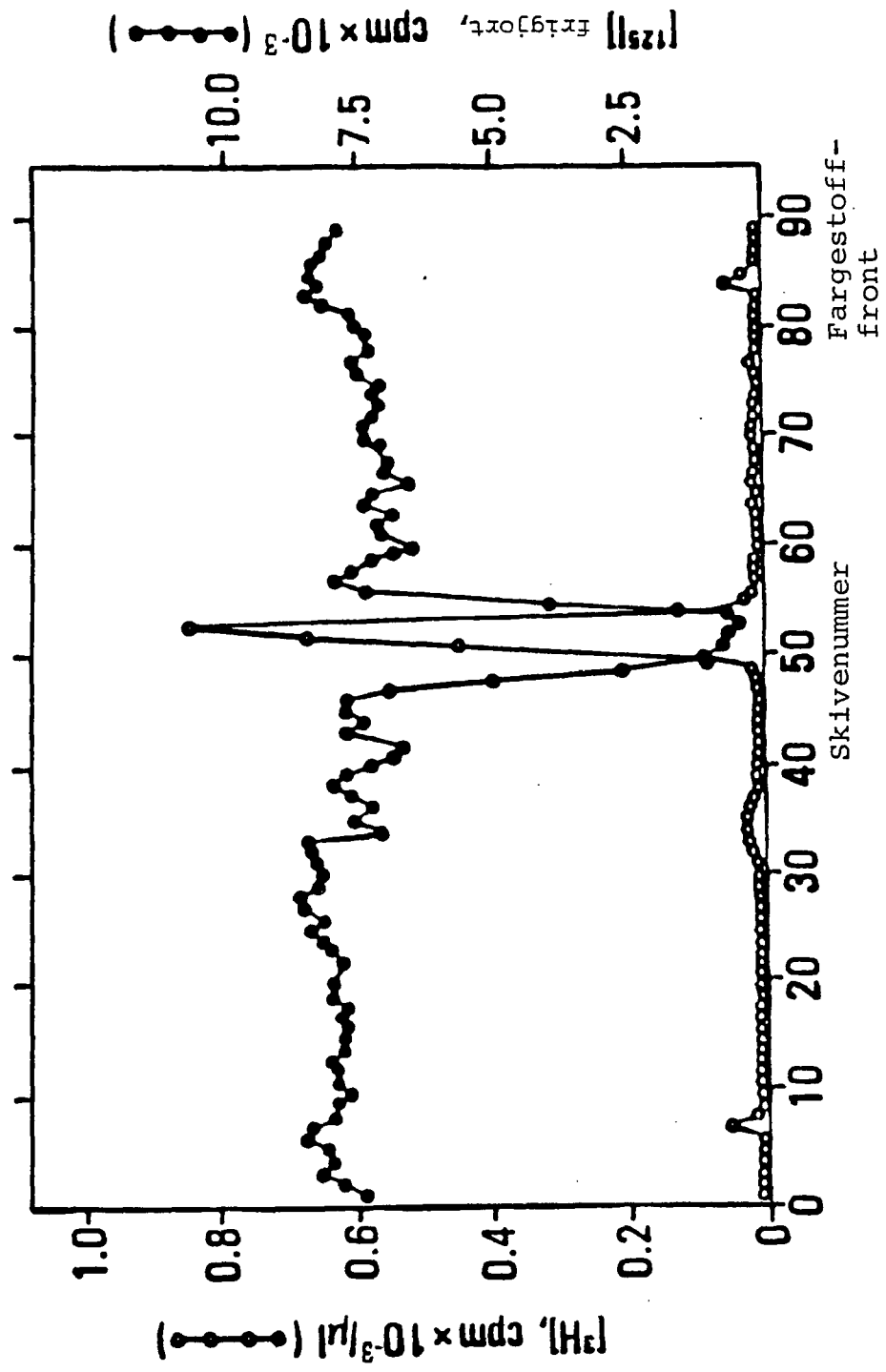


FIG. 7

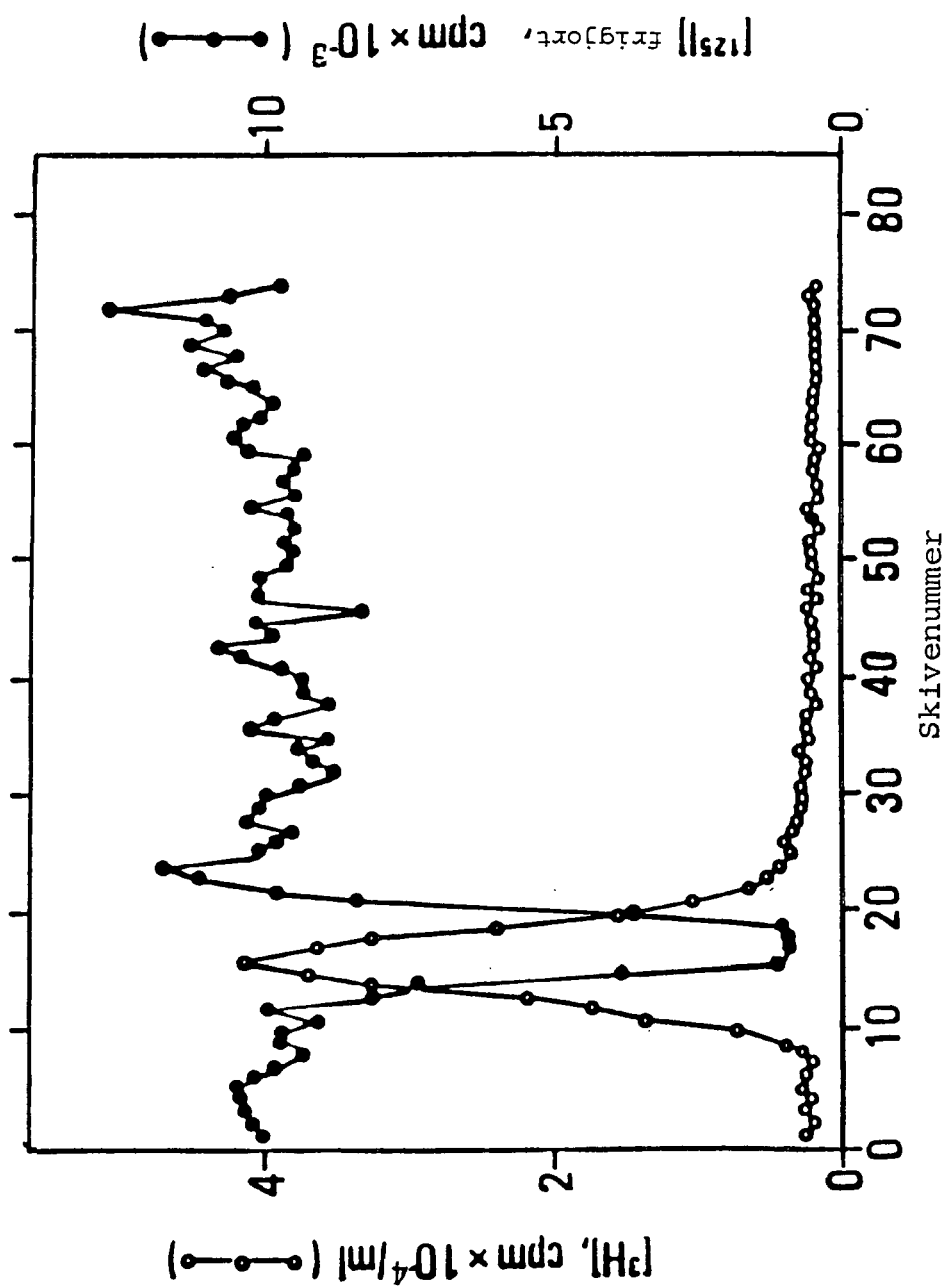


FIG. 8

FIG. 9

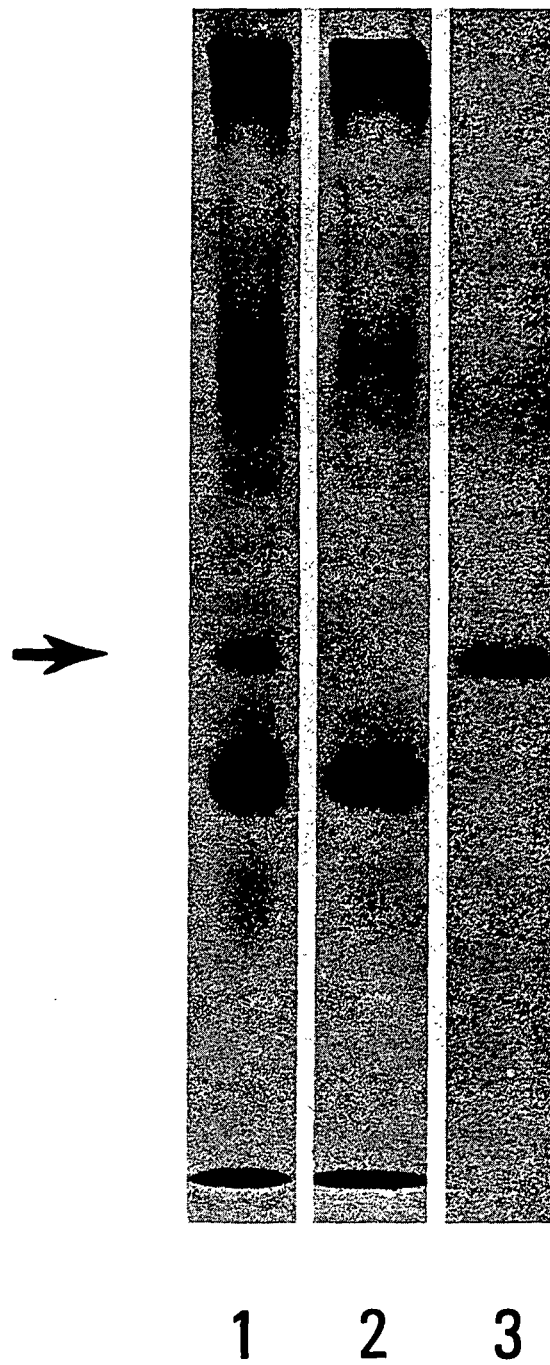
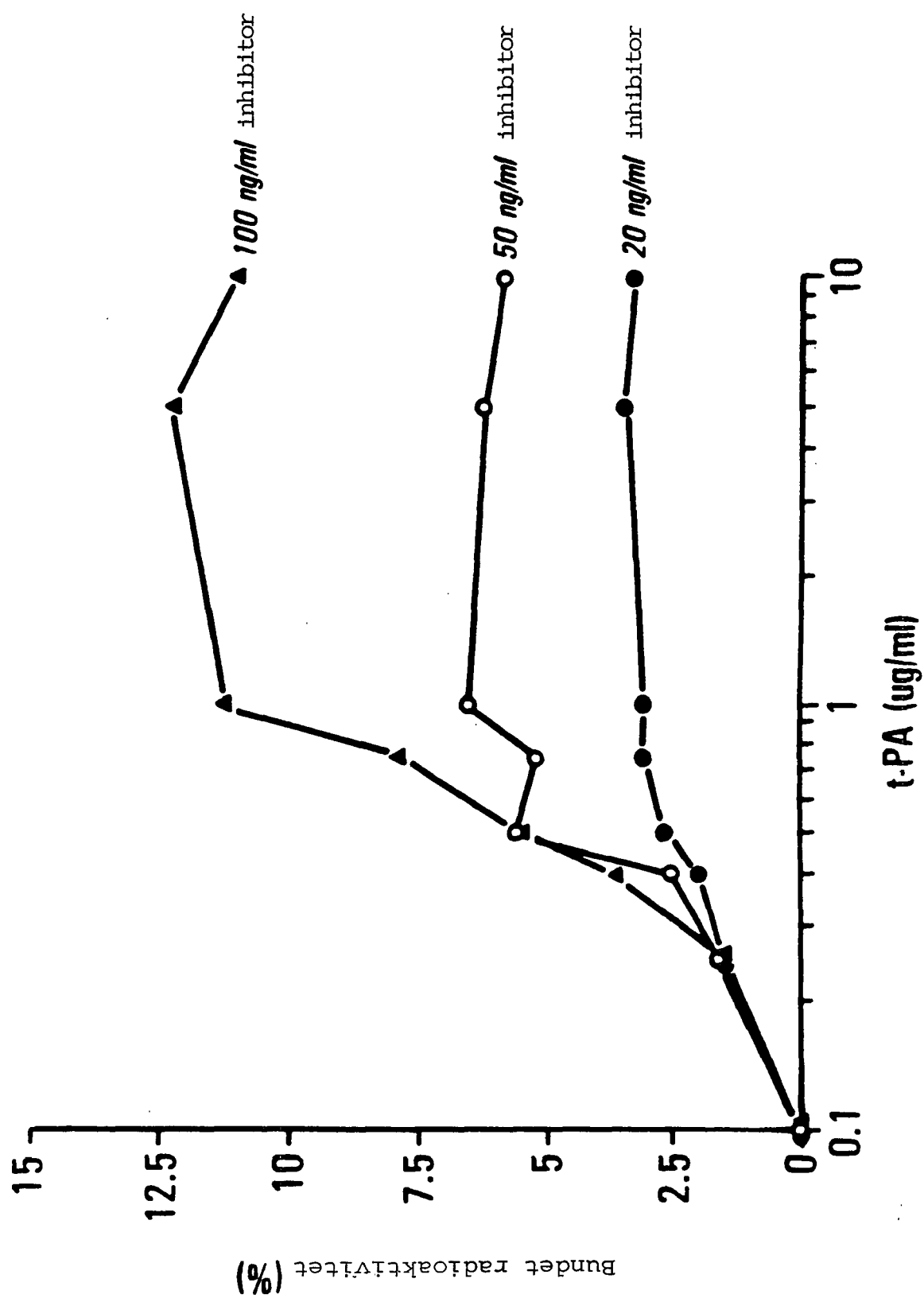


FIG. 10



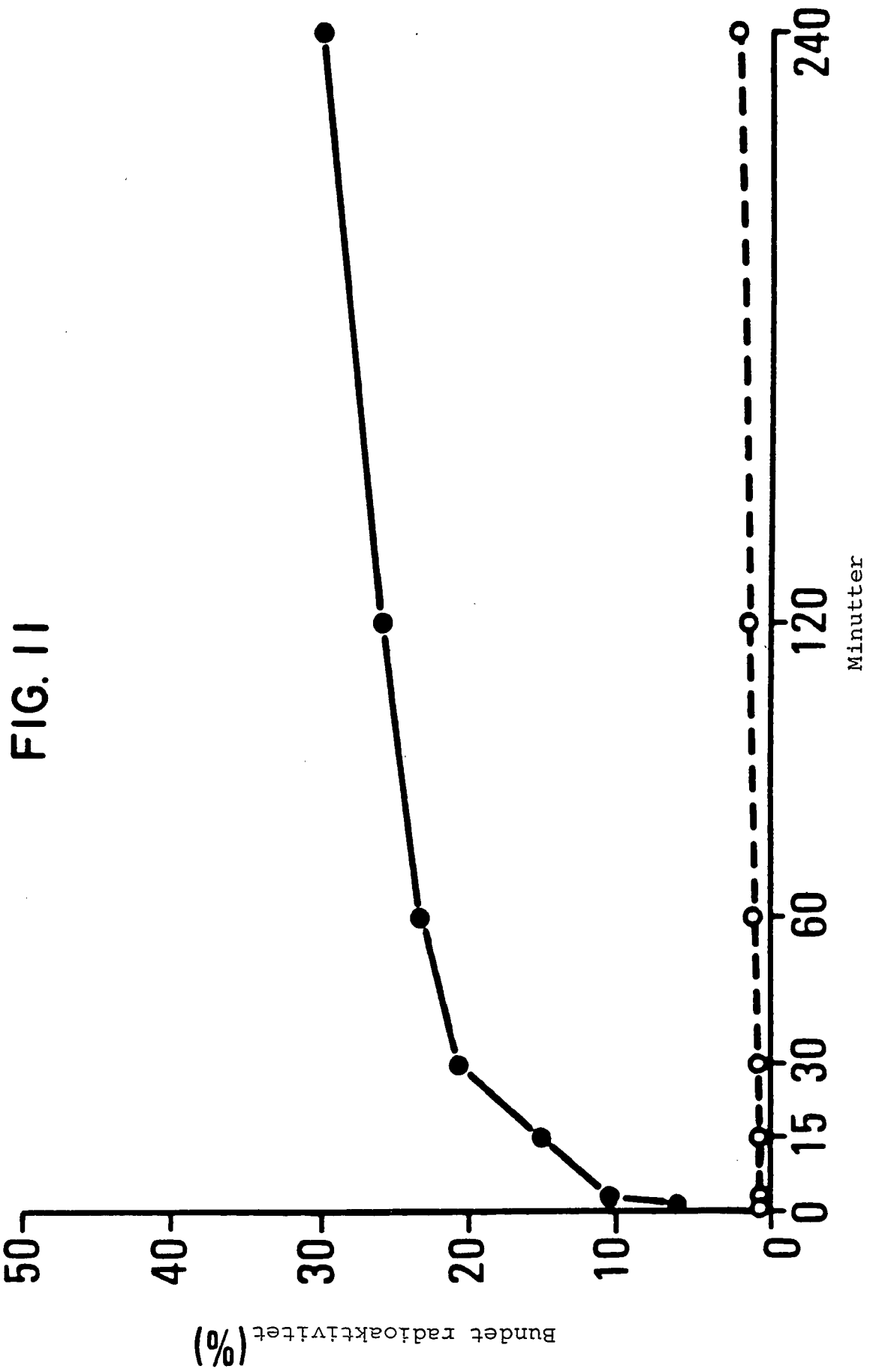


FIG. 12

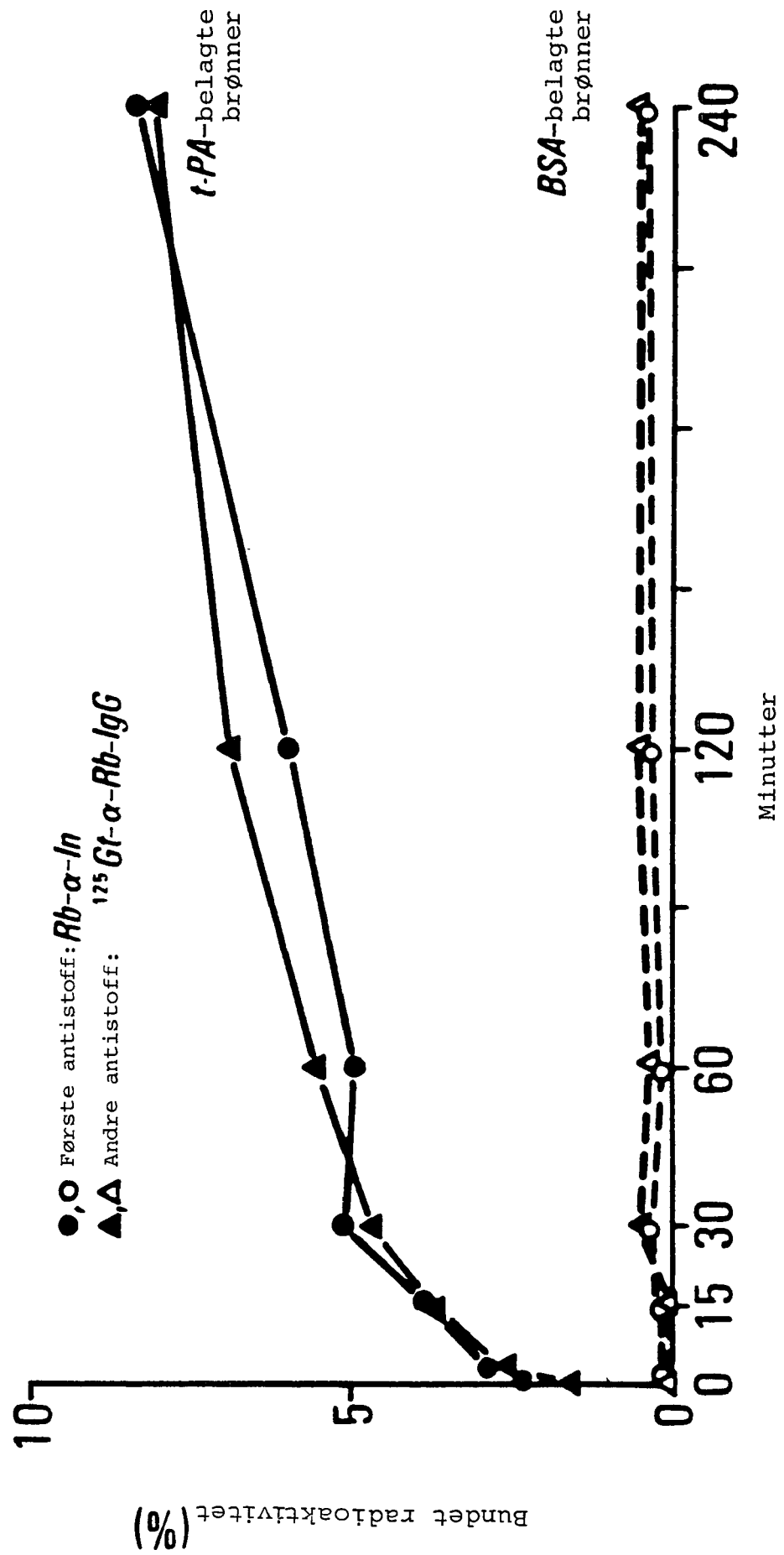


FIG. 13

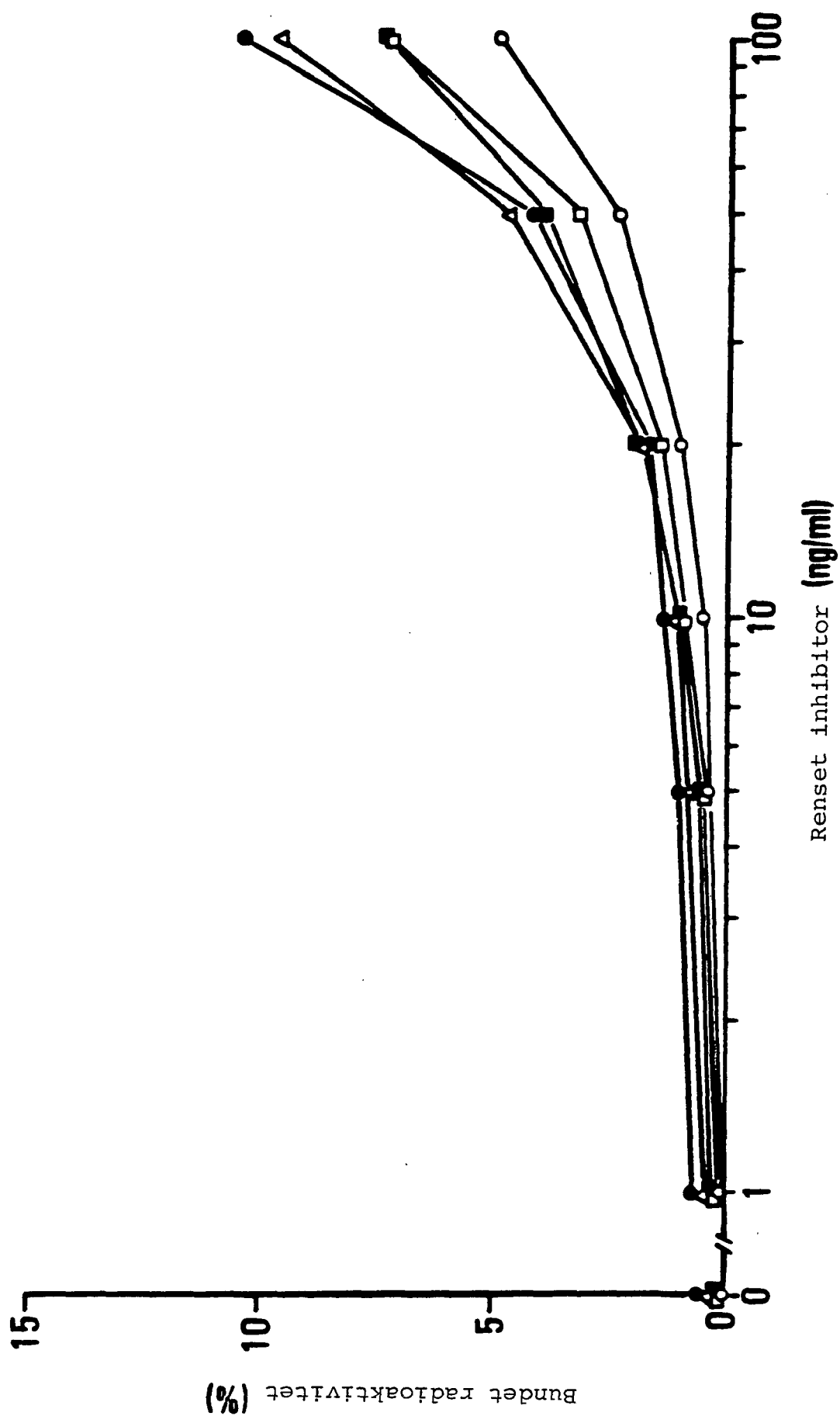
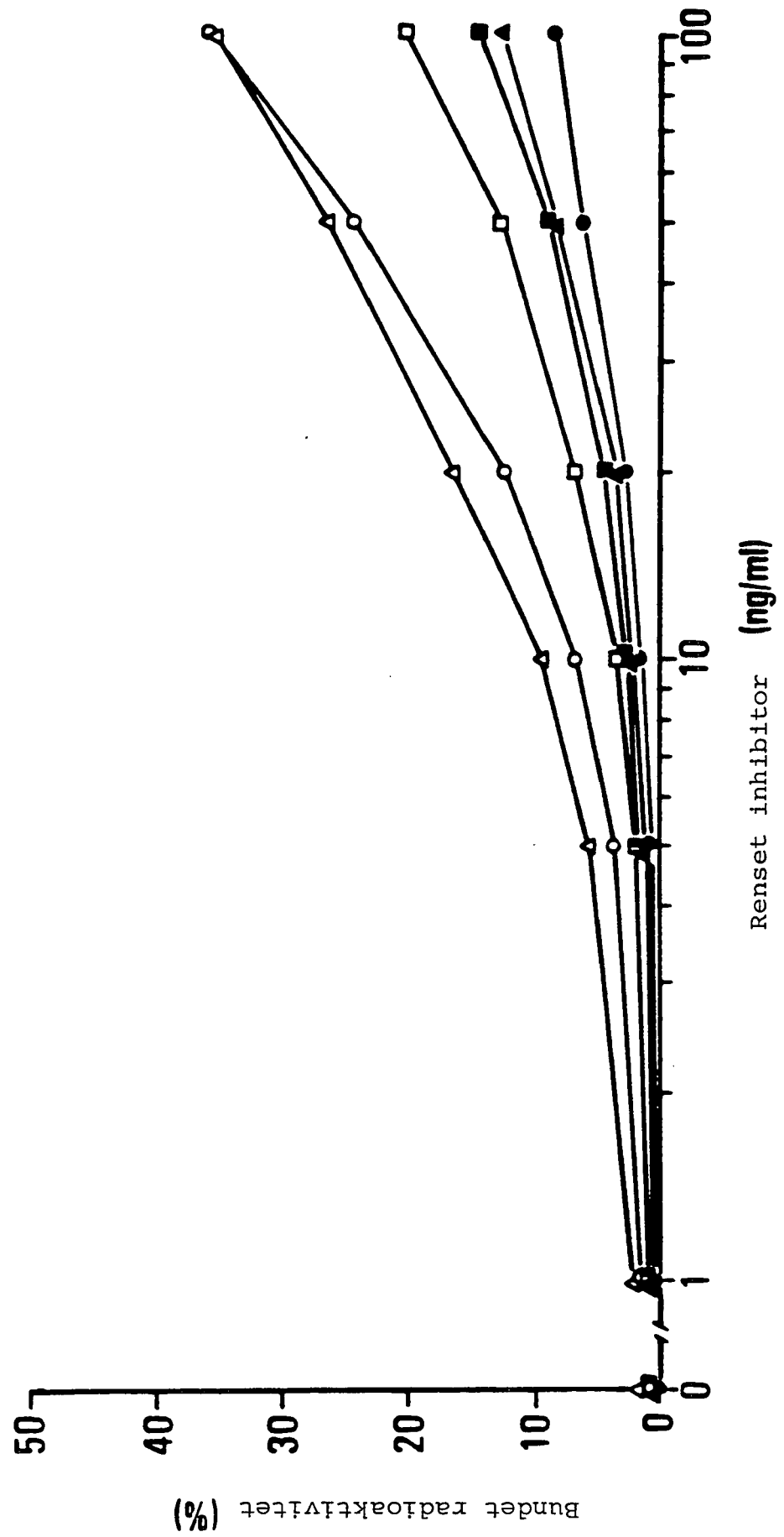


FIG. 14



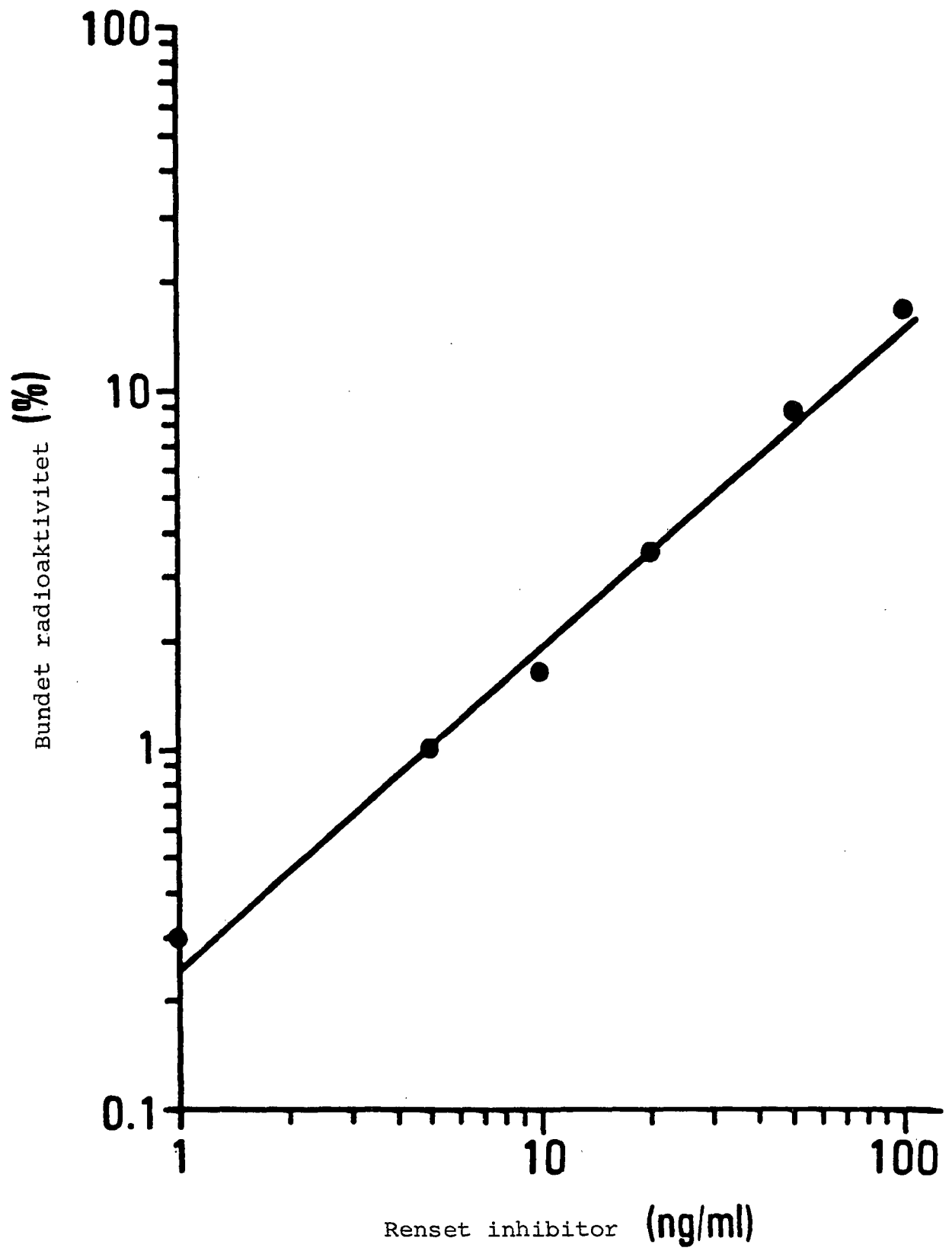
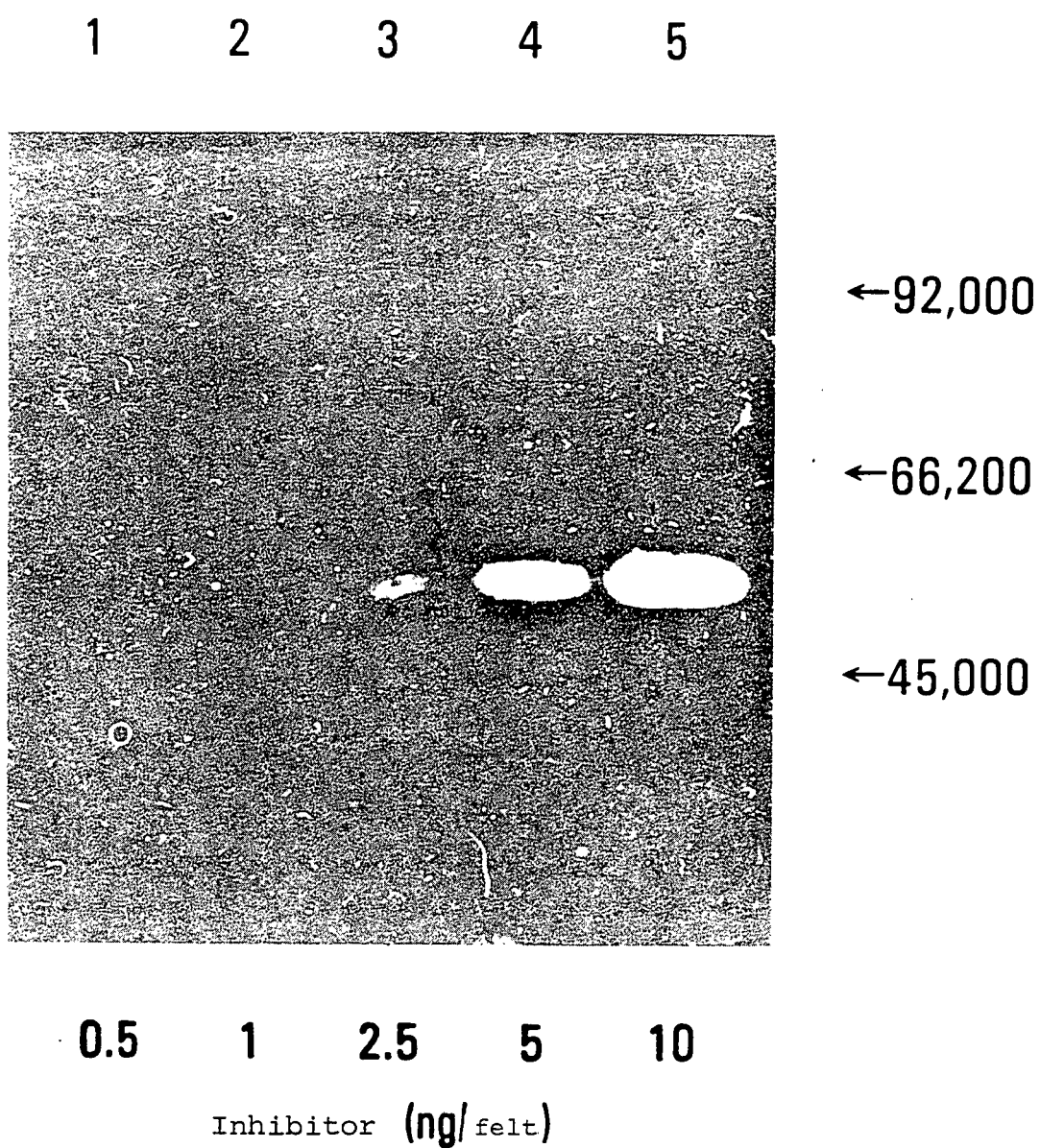


FIG. 16

FIG. 17

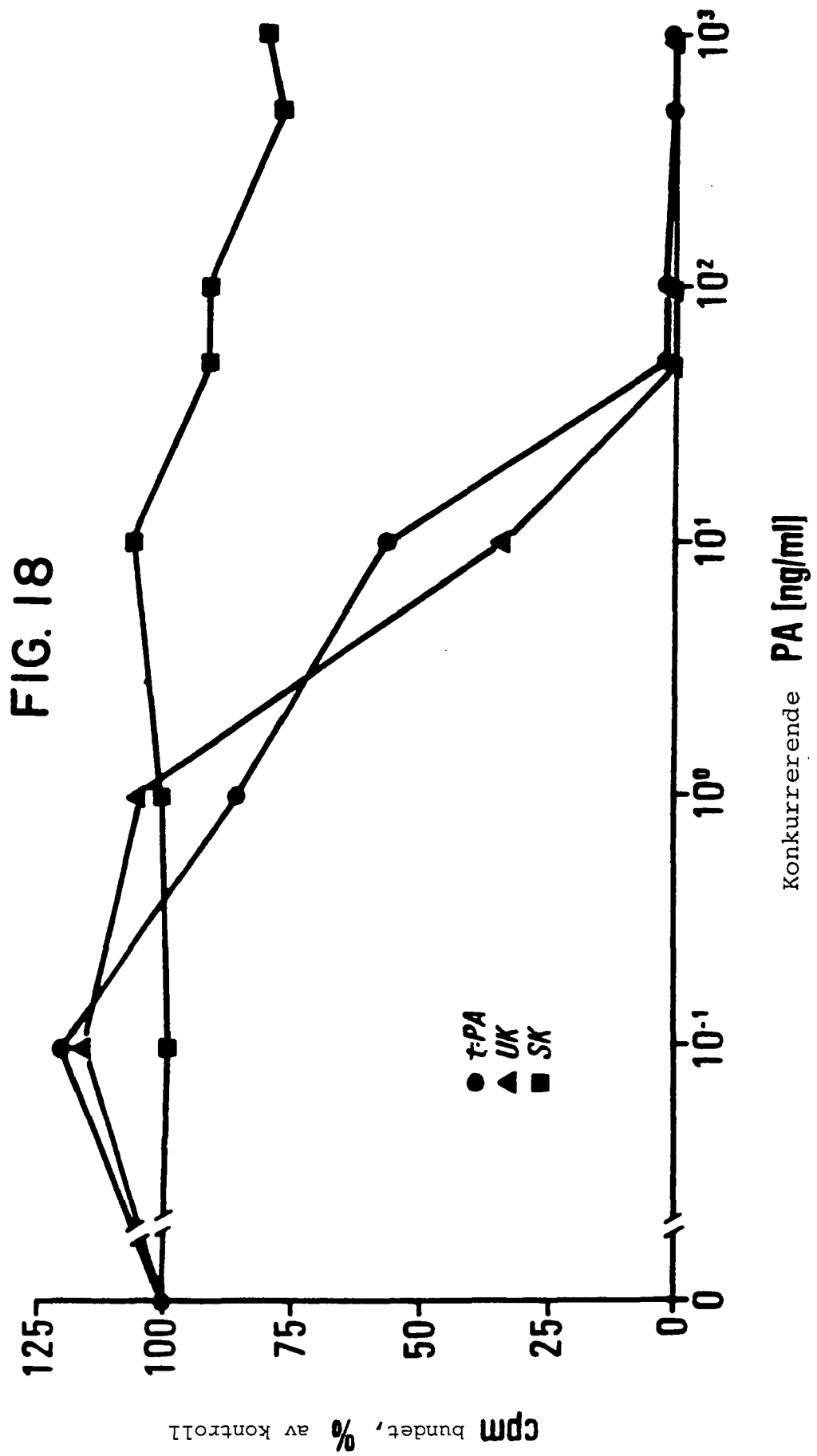




FIG. 19

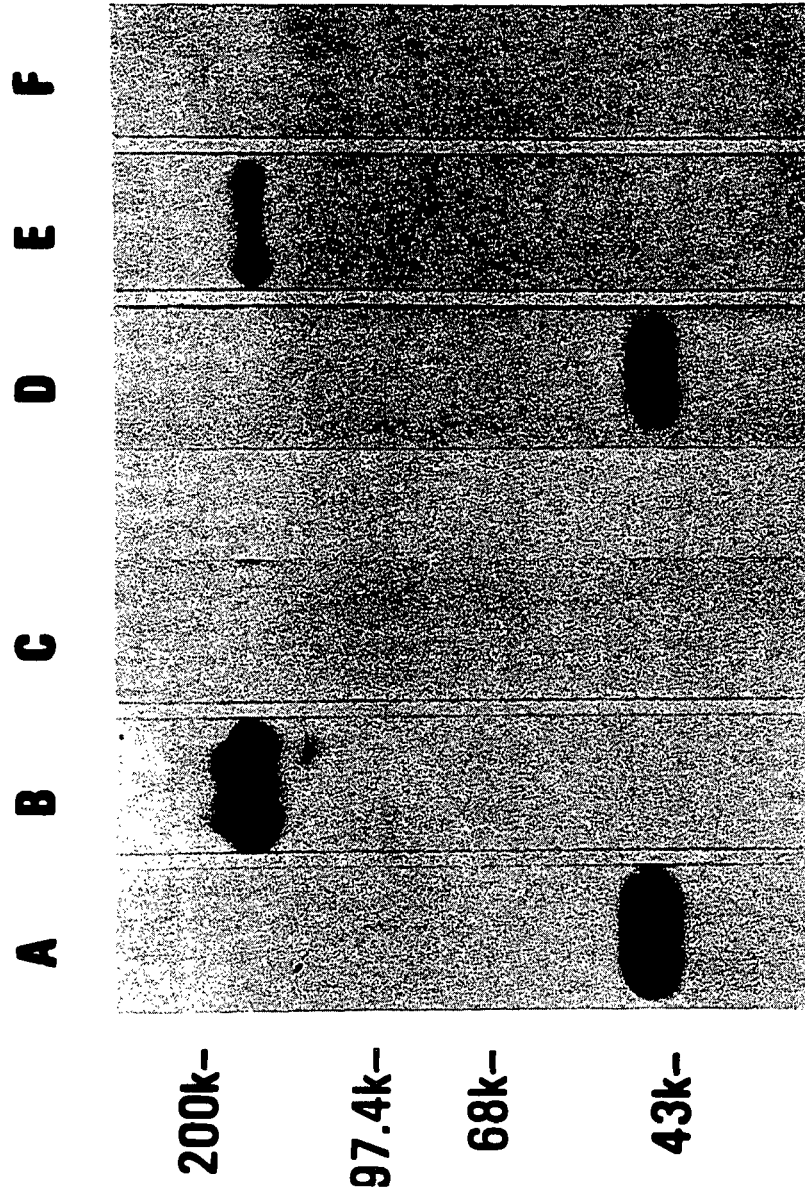


FIG. 20

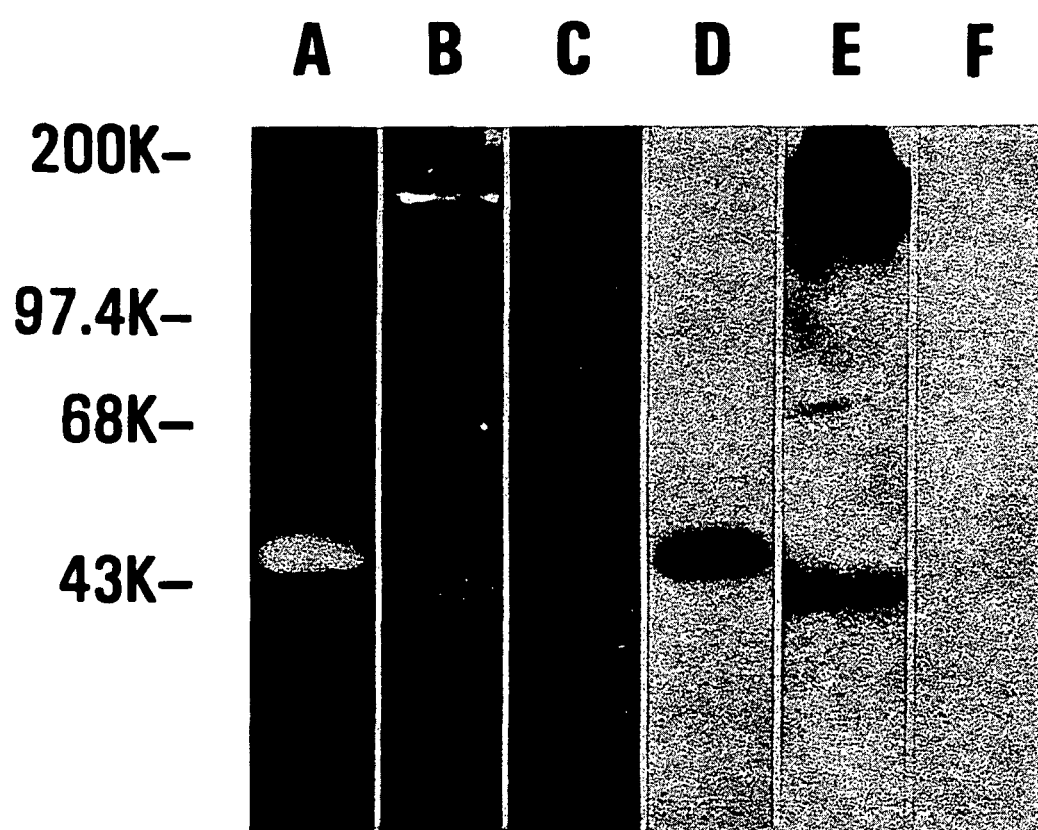
**FIG. 21**

FIG. 22

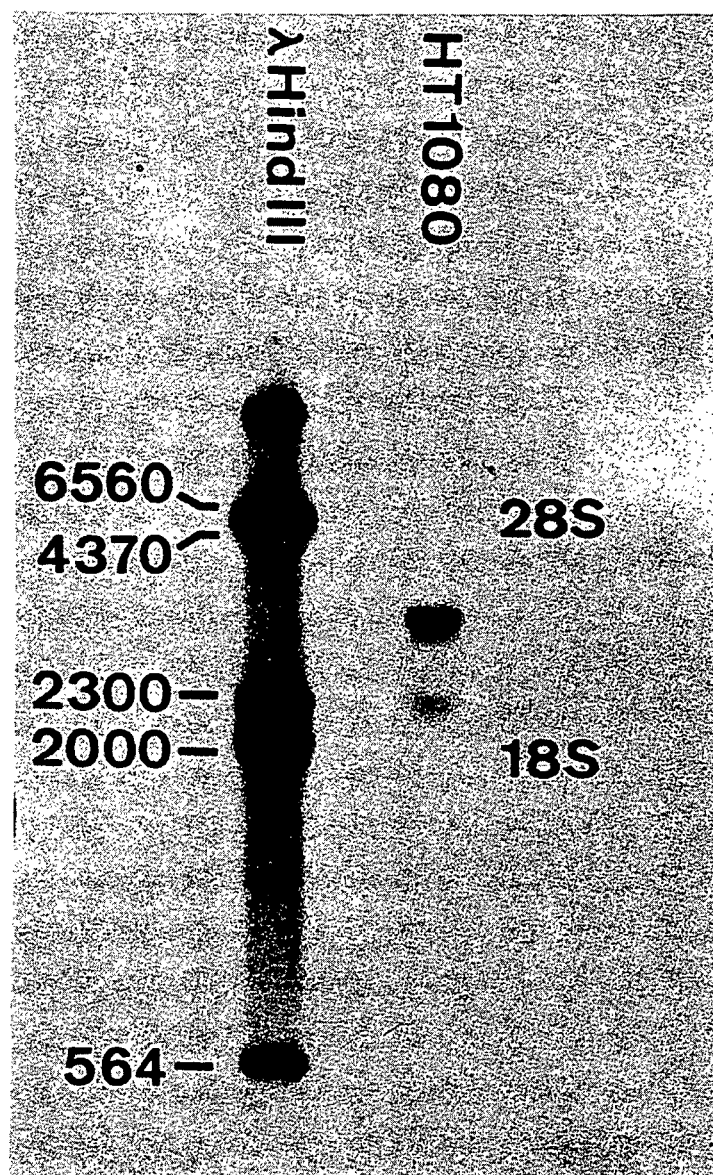


FIG. 23

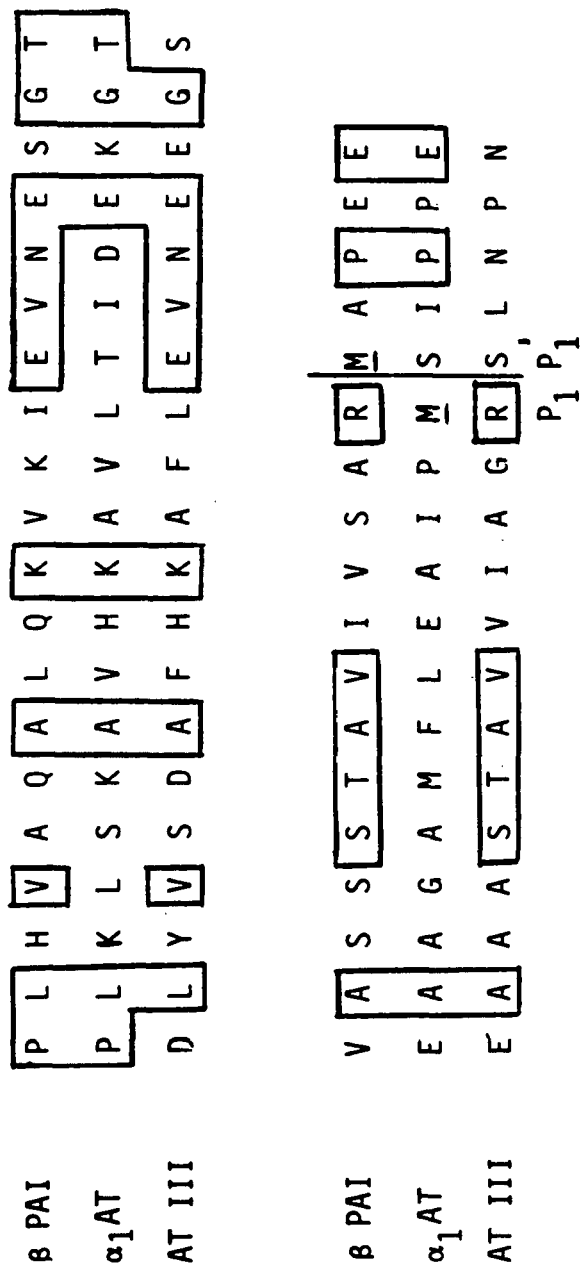


FIG. 24