

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

**PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE**

(10) FI 932425 A7

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application **932425**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 9/64

C12N 15/57

C12N 15/11

C12Q 1/68

C07H 21/04

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **27.05.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **27.05.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **29.11.1993**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

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

28.05.1992 US 891542

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Eli Lilly and Company, Lilly Corporate Center, INDIANAPOLIS, IN 46285, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Dixon, Eric Paul, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Johnstone, Edward Marion, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Little, Sheila Parks, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 • Norris, Franklin Harpold, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Proteaasi ja siihen liittyviä DNA-yhdisteitä

Proteas och relaterade DNA-föreningar

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

B-18971 NRRL

Proteaasi ja siihen liittyviä DNA-yhdisteitä

Peptidi, jossa on 42 - 43 jäännöstä ja joka tunnetaan β -amyloidipeptidinä (β /A4), on yhdistetty Alzheimerin tautiin ja Downin syndroomaan. Tutkijat olettavat, että tämän 4 kilodaltonin (kd) proteiinin epänormaali kertyminen aivoihin johtuu suuremman edeltäjäproteiinin, jota nimitetään amyloidin edeltäjäproteiiniksi (APP), lohkaamisesta. APP:n normaali halkaisu tapahtuu A4-alueella, mikä osoittaa, että esiintyy vaihtoehtoinen halkaisutapahtuma, kun normaali täysipitkä muoto syntyy. β /A4:n aminoterminaalinen jäännös on useimmiten asparagiinihappo (Asp), mikä viittaa siihen, että proteaasi, joka katkaisee APP:n asemassa 596 olevan metioniinin (Met) [Met₅₉₆ käytettäessä numerointijärjestelmää J. Kangin et al. mukaan, Nature 325 (1987) 733] ja Asp₅₉₇:n välistä, aikaansaa amyloidin. Sen vuoksi proteaasit, jotka katkaisevat APP:n siten että syntyy β /A4, ovat tärkeitä apuvälineitä Alzheimerin taudin ja Downin syndrooman karakterisointia varten.

Aikaisemmin tutkijat ovat yrittäneet karakterisoida epänormaalia katkaisutapahtumaa käyttämällä klassisia proteiininpuhdistustekniikkoja. Nämä tutkimukset ovat johtaneet selostuksiin osittain puhdistetusta 68 kilodaltonin proteaasista, joka katkaisee synteettisen peptidin Met - Asp-sidoksen kohdalta. C. Abraham et al., Neurobiology of Aging 11A (1990) 303. Vuonna 1991 Abraham ja avustajat vertasivat 68 kilodaltonin proteaasin katkaisutapaa tunnettuihin seriiniproteaaseihin. C. Abraham et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 174 (1991) 790. Myöhemmin samat tutkijat selostivat, että aikaisemmissa tutkimuksissa havaittu aktiivisuus oli itse asiassa kahden itsenäisen proteaasin vaikutusta. Toinen identifioitiin kalsiumista riippuvaiseksi seriiniproteaasiksi ja toinen systeiniimetalliproteaasiksi. C. Abraham et al., Journal of Cellular Biochemistry 15 (1991) 115; C.

Abraham et al., Journal of Neurochemistry 57 (1991) 5109. Näiden proteaasien rakennetta tai karakterisointia ei esitelty.

Tämä keksintö tarjoaa uuden entsyymin, joka eroaa rakenteeltaan aikaisemin kuvatuista ja joka katkaisee APP:n aikaansaaden amyloidogeenisiä fragmentteja, jotka ovat kooltaan Met₅₉₆ - Asp₅₉₇-katkaisun tapauksessa odotetun mukaisia. Uusi entsyymi on siten hyvin hyödyllinen Alzheimerin taudin ja Downin syndrooman karakterisoinnin edistämisessä. Lisäksi keksinnön käyttö voi johtaa näiden tai muiden näiden kanssa yhteen kuuluvien sairauksien hoitoihin.

Tähän mennessä ei ole ollut tyydyttävää keinoja diagnosoida Alzheimerin tauti henkilöllä ennen kuin dementia ilmenee täydellisesti. Dementian aiheutumisen Alzheimerin taudista vahvistaminen vaatii sairastuneen potilaan aivojen kuoleman jälkeisen tutkimisen. Tämä keksintö tarjoaa keinon määrittää sellaiset potilaat, joilla on Alzheimerin tauti tai alttius Alzheimerin taudin kehittymiselle, näiden potilaiden ollessa vielä elossa.

Selvyyden vuoksi ja tässä esitellyn ja patenttivaatimuksiin sisältyvän keksinnön ymmärtämisen auttamiseksi määritellään alla seuraavat ilmaukset.

"293-solut" viittaa yleisesti saatavissa olevaan transformoituun ihmisen primaariseen sikiökautiseen munuaissolulinjaan, joka on kuvattu julkaisussa F.L. Graham et al., Journal of General Virology 36 (1977) 59 - 72. Tämä solulinja voidaan saada esimerkiksi kokoelmasta the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 10852 - 1776 (ATCC) talletusnumerolla ATCC CRL 1573.

"AV12-solut" viittaa toiseen yleisesti saatavissa olevaan solulinjaan, joka voidaan saada ATCC-kokoelmasta talletusnumerolla ATCC CRL 9595.

"Amyloidogeeninen fragmentti" - APP-fragmentti, joka käsittää β /A4-peptidin.

"Funktionaalinen yhdiste, jossa on SEQ ID NO:1" - Yhdiste, joka käsittää SEQ ID NO:1:n ja joka kykenee katkaisemaan APP:n.

"Kunitz-tyyppinen domeeni" - Soijapavun trypsiinin inhibiittoria muistuttava proteaasien inhibiittori tai nukleiinihapposekvenssi, joka koodaa soijapavun trypsiinin inhibiittoria muistuttavan proteaasien inhibiittorin. Esimerkiksi APP:n Kunitz-proteaasin inhibiittori (KPI) -alue, joka on kuvattu julkaisussa P. Ponte et al., Nature 331 (1988) 525 tai R.E. Tanzi et al., Nature 331 (1988) 528 tai N. Kitaguchi et al., Nature 331 (1988) 530, on Kunitz-tyyppinen domeeni.

"pRc/Zyme" - Modifioitu pRc/CMV-eukaryootti-ilmentämisvektori, joka pRc/CMV-vektori on kaupallisesti saatavissa (Invitrogen Corporation, 3985 Sorrento-Valley Blvd., Suite B, San Diego, California 92121). Plasmidi pRc/Zyme sisältää ihmisen sytomegaloviruksen promoottorin ja vahvistajan (enhancer), naudan kasvuhormonin polyadenylaatio-signaalin, neomysiiniresistenssigeenin, beetalaktamaasigeenin, joka on hyödyllinen ampisilliiniresistenssimerkkigeeninä bakteerissa E. coli, ja monia muita ominaisuuksia kuten on kuvattu luettelossa 1991 Invitrogen Catalog, s. 29, sekä NotI/SalI-insertin, jossa on 1451 emäsparia ja joka sisältää kokonaisuudessaan Zymen koodaavan alueen.

"pSZyme" - Modifioitu E. coli -kloonausvektori pSPORT-1TM [kuvattu julkaisussa E.Y. Chen et al., DNA 4 (1985) 165], joka plasmidi pSPORT-1TM on kaupallisesti saatavissa (Gibco-BRL, 8400 Helgeman Court, Gaithersburg, Maryland 20877). Tämä plasmidi sisältää replikaation aloituskohdan pUC-vektorista, joka plasmidi on kuvattu julkaisussa Yanisch-Perron et al., Gene 33 (1985) 103 - 119; beetalaktamaasigeenin, joka antaa ampisilliiniresistens-

sin; NotI/SalI-insertin, jossa on 1451 emäsparia ja joka sisältää koko Zymen koodaavan alueen; sekä muita piirteitä.

5 "SEQ ID NO:1:n osa" - Vähintään 6 peräkkäistä SEQ ID NO:1:n aminohappojäännöstä.

"mRNA" - ribonukleiinihappo (RNA), joka on kopioitu joko in vivo tai iv vitro, mukaan lukien esimerkiksi RNA-kopioita, jotka on valmistettu in vitro kopioimalla DNA:n koodaavia sekvenssejä RNA-polymeraasin avulla.

10 "SEQ ID NO:1 tai sen funktionaalinen vastine" - SEQ ID NO:1 tai SEQ ID NO:1:n aminohapposekvenssin konservatiivinen muutos, jossa säilyttävä muutos johtaa yhdisteeseen, joka osoittaa oleellisesti samoja biologisia, biokemiallisia, kemiallisia, fysikaalisia ja rakenteellisia ominaisuuksia kuin SEQ ID NO:1.

"SEQ ID NO:3" - DNA-sekvenssi ATG GCT GGC GGC ATC ATA GTC AGG G.

"SEQ ID NO:4" - DNA-sekvenssi AAC CGA ATC TTC AGG TCT TCC TGG GG.

20 "SEQ ID NO:5" - DNA-sekvenssi TCG CTC TCT CCT GGG GAC ACA GA.

"SEQ ID NO:6" - DNA-sekvenssi CCA GGT GCT ATT CCA TGT ATG TCA TAG.

25 "SEQ ID NO:7" - DNA-sekvenssi TCT GTG TCC CCA GGA GAG AGC GA.

"SEQ ID NO:8" - DNA-sekvenssi ATA GTG AAG CTG TCT TCT CAA T.

30 "Transfektio" - mikä tahansa nukleiinihapon siirto isäntäsoluun, mitä joko seuraa tai ei seuraa mainitun nukleiinihapon integroituminen mainitun isäntäsolun genomiin.

"Zyme" - aminohapposekvenssi SEQ ID NO:1 tai sen funktionaalinen vastine.

35 "Zymeen liittyvä vyö (band) -konfiguraatio" - toinen kahdesta vyökonfiguraatiosta, joka on valittu tässä esitellyn restriktiofragmenttipolymorfian kahdesta vyö-

konfiguraatiosta. Toisessa mallissa on 2400 emäsparin vyö muttei 2500 emäsparin vyötä. Toisessa mallissa on 2500:n vyö muttei 2400 emäsparin vyötä.

Tämä keksintö tarjoaa aminohappoyhdisteitä, jotka
5 sisältävät aminohapposekvenssin

[illegible]

joka jäljempänä määritellään nimityksellä SEQ ID NO:1, tai sen funktionaalisen vastineen. Erikoisesti on edullinen aminohappoyhdiste, joka on SEQ ID NO:1.

Alan ammatti-ihmiset käsittävät, että jotkut sekvenssin SEQ ID NO:1 muutokset eivät muuta aminohappoyhdisteen funktiota. Esimerkiksi joitakin hydrofobisia aminohappoja voidaan vaihtaa muihin hydrofobisiin aminohappoihin, aminohappoja, joilla on samankaltaiset sivuketjut, voidaan vaihtaa toisiinsa, emäksisiä aminohappoja voidaan vaihtaa toisiin emäksisiin aminohappoihin, happamia aminohappoja voidaan vaihtaa toisiin happamiin aminohappoihin, pieniä aminohappoja voidaan vaihtaa toisiin pieniin aminohappoihin tai voidaan tehdä erilaisia muita säilyttäviä vaihtoja. Sellaiset muutetut aminohappoyhdisteet, jotka aikaansaavat oleellisesti saman funktion oleellisesti samalla tavalla kuin esitetty aminohappoyhdiste, sisältyvät myös tähän keksintöön.

Alan ammatti-ihmiset huomaavat myös, että tämä proteiini voidaan syntetisoida monien erilaisten menetelmien avulla. Kaikki tämän keksinnön mukaiset aminohappoyhdisteet voidaan valmistaa käyttäen alalla tunnettuja kemiallisia menetelmiä mukaan lukien kiinteään faasin peptidisynteesi tai rekombinanttimenetelmiä. Kumpiakin menetelmiä on kuvattu US-patentissa 4 617 149. Rekombinanttimenetelmät ovat edullisia, jos halutaan suuri saanto. Yleinen menetelmä minkä tahansa halutun DNA-sekvenssin rakentamiseksi on annettu julkaisussa Brown et al., Methods in Enzymology 68 (1979) 109.

Muita valmistustapoja tunnetaan. Ilmentäminen eukaryoottisoluihin voidaan suorittaa käyttäen SEQ ID NO:2, joka on kuvattu alempana. Esimerkiksi voidaan aminohappoyhdisteet tuottaa eukaryoottisoluihin käyttäen simianvirus 40:stä, sytomegaloviruksesta tai hiiren nisäkasvainviruksesta saatua ilmentämisvektoria, joka sisältää SEQ ID NO:1:n koodaavan DNA:n. Kuten alalla on tunnettua, jotkut

virukset ovat myös sopivia vektoreita. Esimerkiksi adeno-
virus, vacciniavirus, herpes-virus, baculovirus ja Rousin
sarkooma -virus ovat hyödyllisiä. Tällainen menetelmä on
kuvattu US-patentissa 4 775 624. Useita vaihtoehtoisia
5 ilmentämismenetelmiä on kuvattu julkaisussa J. Sambrook et
al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, kappaleet 16
ja 17 (1989).

Vielä yhdessä suoritusmuodossa tämä keksintö si-
sältää nukleiinihappoyhdisteitä, jotka käsittävät SEQ ID
10 NO:1:n koodaavia nukleiinihapposekvenssejä. Kuten alan
ammatti-ihmiset tietävät, monet erilaiset nukleiinihappo-
sekvenssit voivat koodata keksinnön mukaiset aminohappo-
yhdisteet geneettisen koodin degeneraation johdosta, jossa
geneettisessä koodissa useimmat aminohapot koodaa useampi
15 kuin yksi nukleiinihappotripletti. Koska nämä vaihtoehtoi-
set nukleiinihapposekvenssit koodaisivat samat aminohappo-
sekvenssit, tämä keksintö käsittää lisäksi nämä vaihtoehtoi-
set nukleiinihapposekvenssit. Edullisesti nukleiinihap-
poyhdiste on DNA, koodaava tai koodaavan vastasäie (sense
tai antisense) -mRNA. Zymen koodaavan DNA-yhdisteen edul-
20 lisimmalla toteutusmuodolla on tämä sekvenssi:

	ATGAAGAAGC TGATGGTGGT GCTGAGTCTG ATTGCTGCAG CCTGGGCAGA	50
	GGAGCAGAAAT AAGTTGGTGC ATGGCGGACC CTGCGACAAG ACATCTCACC	100
	CCTACCAAGC TGCCCTCTAC ACCTCGGGCC ACTTGCTCTG TGGTGGGGTC	150
25	CTTATCCATC CACTGTGGGT CCTCACAGCT GCCCCACTGCA AAAAACCAGAA	200
	TCTTCAGGTC TTCCTGGGGA AGCATAACCT TCGGCAAAGG GAGAGTTCCC	250
	AGGAGCAGAG TTCTGTTGTC CGGGCTGTGA TCCACCCTGA CTATGATGCC	300
	GCCAGCCATG ACCAGGACAT CATGCTGTTG CGCCTGGCAC GCCCAGCCAA	350
	ACTCTCTGAA CTCATCCAGC CCCTTCCCCCT GGAGAGGGAC TGCTCAGCCA	400
30	ACACCACCAG CTGCCACATC CTGGGCTGGG GCAAGACAGC AGATGGTGAT	450
	TTCCCTGACA CCATCCAGTG TGCATACATC CACCTGGTGT CCCGTGAGGA	500
	GTGTGAGCAT GCCTACCCTG GCCAGATCAC CCAGAACATG TTGTGTGCTG	550
	GGGATGAGAA GTACGGGAAG GATTCCCTGCC AGGGTGATTG TGGGGGTCCG	600
	CTGGTATGTG GAGACCACCT CCGAGGCCTT GTGTCATGGG GTAACATCCC	650
35	CTGTGGATCA AAGGAGAAGC CAGGAGTCTA CACCAACGTC TGCAGATACA	700
	CGAACTGGAT CCAAAAAACC ATTCAGGCCA AG	732

joka jäljempänä määritellään nimityksellä SEQ ID NO:2. Edullisia ovat kuitenkin myös ne nukleiinihappoyhdisteet, jotka ovat koodaava ja koodaavan vastasäie-mRNA.

Tämä keksintö tarjoaa myös nukleiinihappovektoreita, jotka sisältävät SEQ ID NO:1:n tai sen funktionaalisen vastineen koodaavia nukleiinihappoja. Edullisina pidetään nukleiinihappovektoreita, jotka ovat DNA:ta. Edullisimpia ovat DNA-vektorit, jotka sisältävät DNA-sekvenssin, joka on SEQ ID NO:2. Erityisen edullinen DNA-vektori on plasmidi pSZyme.

E. coli/pSZyme, joka sisältää SEQ ID NO:2:n sisältävän kloonausvektorin, on talletettu ja tehty osaksi laboratorion the Northern Regional Research Laboratories (NRRL), Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, 61604, kantaviljelmäkoelmaa 29. huhtikuuta 1992 talletusnumerolla NRRL B-18971. SEQ ID NO:2 voidaan eristää plasmidista esimerkiksi 1451 emäsparin NotI/SalI-restriktiofragmenttina. Muutkin fragmentit ovat käyttökelpoisia SEQ ID NO:2:n hankkimisessa.

Lisäksi DNA-sekvenssit voidaan syntetisoida käyttäen kaupallisesti saatavissa olevia automatisoituja DNA-syntetisoijia kuten ABS (Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404) 380B DNA-syntetisoija. DNA-sekvenssit voidaan myös aikaansaada polymeerasiketjureaktion (PCR) avulla kuten on kuvattu US-patentissa 4 889 818.

Tarjotaan myös näiden vektorien restriktiofragmentteja. Edulliset fragmentit ovat pSZymen 1451 emäsparin NotI/SalI-restriktiofragmentti, 803 emäsparin BsrBI/Esp3I-restriktiofragmentti ja 815 emäsparin EcoNI/BfaI-restriktiofragmentti.

Lisäksi tämän keksinnön mukaiset DNA-vektorit edullisesti sisältävät promoottorin sijoitettuna aikaansaamaan SEQ ID NO:2:n tai sen funktionaalisen vastineen

ilmentymistä. Edullisia ovat sellaiset vektorit, joissa mainittu promoottori toimii ihmisen sikiökautisissa munuaissoluissa (293-solut), AV12-soluissa, hiivasoluissa tai Escherichia coli -soluissa. Edullisin DNA:n ilmentämisvektori on plasmidi pRc/Zyme.

Plasmidi pSZyme, joka voidaan eristää E. coli -soluista käyttäen yleisiä tekniikkoja, voidaan helposti modifioida sellaisten ilmentämisvektorien rakentamiseksi, jotka tuottavat Zymeä monissa eri organismeissa mukaan lukien esimerkiksi E. coli, heimon Saccharomyces hiiva ja Sf9-solut, jotka ovat peräisin suvun Spodoptera erään kulkuyökköslajin toukan (fall armyworm) munasarjoista (yleisesti käytetty isäntä baculovirusilmentämisjärjestelmiä varten). [Yleisesti käytetyt kirjallisuusviitteet kuten Sambrook et al., yllä, kuvaavat näitä tekniikkoja.]

Nykyinen kirjallisuus sisältää tekniikkoja AV12-ilmentämisvektorien kokoonpanemiseksi ja AV12-isäntäsolujen transfektoimiseksi. Katso esim. US-patentti 4 992 373. Nykyinen kirjallisuus sisältää myös lukuisia tekniikkoja 293-ilmentämisvektorien kokoonpanemiseksi ja 293-isäntäsolujen transfektoimiseksi.

293-soluja varten käytettyjä kokoonpano-ohjeita voidaan noudattaa analogisten vektorien kokoonpanemiseksi muita solulinjoja varten korvaamalla ainoastaan tarpeen vaatiessa säätelyelementit sopivilla käyttäen tunnettuja tekniikkoja. Promoottoreita, joita esimerkiksi voidaan käyttää, ovat tymidiinikinaasipromoottori, metallotioniini-promoottori, lämpöshokkipromoottori, immunoglobuliini-promoottori tai erilaiset viruspromoottorit kuten hiiren nisäkasvainvirus-promoottori, SV40-promoottori, herpesviruspromoottorit tai BK-viruspromoottorit. Lisäksi keino-tekoisesti kokoonpantuja promoottoreita, jotka on saatu "consensus"-sekvensseistä tai aikaansaatu muiden promoottorien hybrideinä, voidaan käyttää tätä keksintöä käyttäen nössä toteutettaessa.

Tämän keksinnön mukaiset DNA-yhdisteet käsittävät myös alukkeita ja koettimia. Tähän keksintöön sisältyy nukleiinihappoyhdisteitä, joissa on vähintään 18 peräkkäistä emäsparia, jotka koodaavat SEQ ID NO:1:n tai osan siitä. Edullisia ovat koettimet tai alukkeet, jotka ovat DNA:ta. Edullisimpia koettimia tai alukkeita ovat: SEQ ID NO:3 ja SEQ ID NO:4. Alan ammatti-ihmiset tietävät koettiin ja alukkeisiin liittyvät tekniikat tunnetuiksi.

Esimerkiksi kokonaista SEQ ID NO:3 tai SEQ ID NO:4 tai osaa niistä voidaan käyttää koodaavaan sekvenssiin hybridisointiin. Täysipitkä sekvenssi voidaan sitten aikaansaada käyttäen polymeraasiketjureaktio (PCR) -monistusta tunnettujen tekniikkojen avulla. Täysipitkä sekvenssi voidaan myöhemmin subkloonata mihin tahansa valittuun vektoriin.

Vaihtoehtoisesti SEQ ID NO:3 tai SEQ ID NO:4 voidaan merkitä radioaktiivisuudella 5'-päästä cDNA-kirjastojen seulomiseksi tavanomaisesti. Lisäksi mikä tahansa Zymen koodaavan DNA:n palanen, jota on sidottu suodattimeen, voidaan kyllästää kokonais-mRNA-kopioilla sitoutuvien mRNA-kopioiden käänteiskopioimiseksi.

Alukkeita ja koettimia voidaan saada alalla tunnetuilla tavoilla. Esimerkiksi kun pSZyme on eristetty, restriktioentsyymejä ja myöhempää geelissä erottelua voidaan käyttää valitun fragmentin eristämiseksi.

Vielä eräs tämän keksinnön toteutusmuoto on Zymen genomiklooni. Edullinen genomiklooni on 4,0 kiloemäksen HindIII-fragmentti ihmisen kromosomi 19 -kirjastosta, joka fragmentti hybridisoituu SEQ ID NO:1:tä koodaaviin DNA-fragmentteihin. Tämä voidaan saada käyttämällä hybridisointia SEQ ID NO:2:n tai sen osien kanssa. Esimerkiksi SEQ ID NO:3 ja SEQ ID NO:4 voidaan merkitä radioaktiivisuudella ja käyttää koettimina kromosomi 19 -kirjaston tutkimiseksi vastaavan genomi-DNA:n identifioimiseksi ja eristämiseksi sitten.

Tämä keksintö tarjoaa myös Alzheimerin tautia koskevan diagnostisen kokeen, jossa ihmisluovuttajan DNA:

1) pilkotaan restriktioentsyymillä TagI;

2) hybridisoidaan merkityn Zyme-DNA:n kanssa Zymeen
5 liittyvän vyökonfiguraation paljastamiseksi ja

3) verrataan luovuttajan perheen niiden jäsenten,
jotka osoittavat tai ovat osoittaneet Alzheimerin taudin
oireita, samoin pilkottuihin ja hybridisoituihin vyökon-
figuraatioihin. Edullisessa Alzheimerin tautia koskevassa
10 diagnostisessa kokeessa käytetään verinäytettä ihmisluo-
vuttajan DNA:n lähteenä.

Koska tässä keksinnössä hankitaan genomi-DNA ja
Zymeen liittyvä restriktiofragmenttien pituuden polymorfia
identifioidaan tämän keksinnön avulla, loppuosa tästä me-
15 netelmästä voidaan suorittaa alalla tunnettujen menetel-
mien mukaan. Esimerkiksi US-patentti 4 666 828 kuvaa näitä
menetelmiä. [Lukuisissa kirjallisuusviitteissä kuten esi-
merkiksi julkaisussa B. Lewin, Genes (1987) s. 78 seloste-
taan restriktiofragmenttien pituuden polymorfian tekniik-
20 koja ja teoriaa.]

Isäntäsoluja, joissa on tämän keksinnön tarjoamia
nukleiinihappoja, sisältyy myös tähän keksintöön. Edulli-
nen isäntäsolu on varhaismunasolu. Edullinen varhaismuna-
solu on sellainen, johon on ruiskutettu tämän keksinnön
25 mukaisia sense-mRNA- tai -DNA-yhdisteitä. Vielä edulli-
sempi varhaismunasolu on sellainen, johon on ruiskutettu
tämän keksinnön mukaisia sense-mRNA- tai -DNA-yhdisteitä
yhdessä sellaisen DNA:n tai mRNA:n kanssa, joka koodaa
APP:n. Edullisimpia tämän keksinnön mukaisia varhaismuna-
30 soluja ovat sellaiset, joihin on ruiskutettu sense-mRNA.

Muita edullisia isäntäsoluja ovat sellaiset, jotka
on transfektoitu SEQ ID NO:2:n sisältävällä vektorilla.
Edullisia SEQ ID NO:2:lla transfektoituja isäntäsoluja
ovat 293, AV12, hiiva ja E. coli -solut. Edullisimpia 293

ja E. coli -isäntäsoluja ovat 293/pRc/Zyme, E. coli/pSZyme.

Edullinen on myös isäntäsolu, joka on yhteistransfektoitu DNA-vektorilla, joka sisältää SEQ ID NO:2:n, ja DNA-vektorilla, joka sisältää APP:n koodaavan sekvenssin. 293-solut, AV12-solut, hiivasolut ja E. coli -solut ovat erityisen hyödyllisiä yhteistransfektoituja isäntäsoluja.

Varhaismunasoluisäntäsolu voidaan aikaansaada käyttäen menetelmää, joka on kuvattu julkaisussa Lübbert et al., Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 84 (1987) 4332. DNA tai RNA, joka koodaa APP:n (sekä 695 että 751 aminohapon muoto) voidaan saada kuten on kuvattu julkaisussa Selkoe et al., Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 85 (1988) 7341. Muiden isäntäsolujen transfektio on alalla tunnettua. Solujen yhteistransfektio voidaan suorittaa käyttäen yleisiä tekniikkoja. Katso esim. Gorman et al., Molecular and Cellular Biology 2 (1982) 1044.

Sen vuoksi tämä keksintö tarjoaa myös menetelmän sellaisen isäntäsolun aikaansaamiseksi, joka kykenee ilmentämään SEQ ID NO:1:tä, joka menetelmä käsittää isäntäsolun transfektoinnin DNA-vektorilla, joka sisältää SEQ ID NO:1:n koodaavan DNA-sekvenssin. Edullisessa menetelmässä käytetään 293-soluja isäntäsoluina. Näitä 293-soluja voidaan saada kokoelmasta ATCC talletusnumerolla ATCC CRL 1573. Toisessa edullisessa menetelmässä käytetään AV12-soluja isäntäsoluina. AV12-soluja voidaan saada kokoelmasta ATCC talletusnumerolla ATCC CRL 9595. Vielä yhdessä edullisessa menetelmässä käytetään heimon Saccharomycetes hiivasoluja tai bakteeria E. coli isäntäsoluina.

Edullisessa menetelmässä käytetään SEQ ID NO:2:n sisältävää ilmentämisvektoria 293-soluissa. Erityisen edullinen tätä tarkoitusta varten on pRc/Zyme.

Toinen edullinen menetelmä sisältää a) DNA-vektorin, joka sisältää SEQ ID NO:2:n, ja b) DNA-ilmentämisvek-

torin, joka sisältää APP:n koodaavan sekvenssin. Erittäin edullisessa menetelmässä käytetään DNA-vektoria pRc/Zyme. Transfektoituja isäntäsoluja voidaan viljellä sellaisissa alan ammatti-ihmisten tuntemissa olosuhteissa että SEQ ID NO:1 ilmentyy, tuottaen siten Zymeä transfektoidussa isäntäsolussa.

Lisäksi keksintö tarjoaa menetelmän sellaisen DNA:n identifioimiseksi, joka on homologinen tämän keksinnön mukaisen koettimen kanssa, jossa menetelmässä yhdistetään koenukleiinihappo koettimen kanssa hybridisointiolosuhteissa ja identifioidaan ne koenukleiinihapot, jotka hybridisoituvat. Edullisimmat koettimet tässä menetelmässä käytettäväksi ovat SEQ ID NO:3 ja SEQ ID NO:4. Hybridisointitekniikat ovat alalla tunnettuja. Katso esim. Sambrook et al. yllä.

Tämä keksintö käsittää myös analyysijä, joissa käytetään tämän keksinnön tarjoamia yhdisteitä. Tarjotut analyysit määrittävät, onko aine Zymen ligandi, jossa menetelmässä saatetaan Zyme kosketuksiin mainitun aineen kanssa, tarkkaillaan Zyme-aktiivisuutta fysikaalisesti todettavissa olevien keinojen avulla ja identifioidaan ne aineet, jotka ovat vuorovaikutuksessa Zymen kanssa tai vaikuttavat siihen.

Edulliset tämän keksinnön mukaiset analyysit käsittävät soluviljelykokeen, korkeapainenestekromatografia (HPLC) -analyysin tai synteettisen kilpailuanalyysin.

Edullisissa soluviljelykokeissa käytetään varhaismunasoluja, AV12, E. coli, hiiva tai 293-soluja, jotka yhteisilmentävät nukleiinihappoja, jotka koodaavat Zymen ja APP:n. Edullisia yhteisilmentävien solujen viljelykokeita ovat sellaiset, joissa käytetään 293/pRc/Zyme. Edullisessa kokeessa käytetään hiivasoluja ja DNA-yhdistettä, joka koodaa APP:n aminohapot 587 - 606. Yksi menetelmä hiivakokeen suorittamiseksi on kuvattu julkaisussa Smith ja Kohorn, Proceedings of the National Academy of

Sciences, USA 88 (1991) 5159, jossa käytetään Zymen koodaavaa DNA:ta ja APP:n koodaavaa DNA:ta, joka sisältää Met₅₉₆/Asp₅₉₇-katkaisukohtakodonit.

5 Edullisimmissa varhaismunasolukokeissa yhteisilmen-
netään mRNA:ta. Edullisimmissa soluviljelykokeissa käyte-
tään Western blot -analyysiä tai radioaktiivisuudella mer-
kittyä APP:tä fysikaalisesti todettavissa olevana keinona.
Edullinen HPLC-analyysi on sellainen, jossa käytetty sub-
straatti on täysipitkä, eukaryootista peräisin oleva APP.

10 Edullisin synteettinen kilpailuanalyysi on sellai-
nen, jossa aine kilpailee Kunitz-tyyppiä oleva domeeni-
-geenituotteen kanssa sitoutumisesta Zymeen. Edullisin
Zyme/Kunitz-domeenikilpailuanalyysi on sellainen, jossa
APP on merkitty radioisotoopilla.

15 Soluviljelykokeet voidaan suorittaa käyttäen mene-
telmiä, jotka on esitetty yksityiskohtaisesti julkaisussa
F. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology
(1989 sivuilla 9.1 - 9.5. HPLC-analyysi voidaan suorittaa
oleellisesti kuten on kuvattu teoksessa Hirs ja Timasheff,
20 toimittajat, Methods in Enzymology, vol. 91, kappaleet V
ja VI (1983). Zyme/Kunitz-tyyppinen domeeni -sitoutumis-
tai kilpailuanalyysi voidaan suorittaa kuten ovat kuvan-
neet J. Bennet ja H. Yamamura, Neurotransmitter Receptor
Binding (1985) kappale 3.

25 Tämä keksintö tarjoaa myös menetelmän Zymen iden-
tifioimiseksi tai puhdistamiseksi, jossa menetelmässä kyl-
lästetään koeproteiini anti-Zyme-vasta-aineella, poiste-
taan sitoutumaton anti-Zyme-vasta-aine ja osoitetaan anti-
Zyme-vasta-aine, joka jää sitoutuneeksi. Vasta-ainekuvaus-
30 tekniikkoja tunnetaan alalla.

Seuraavat ovat esimerkkejä tämän keksinnön puolis-
ta. Nämä esimerkit ovat ainoastaan valaisevia eikä niiden
tarkoiteta rajoittavan keksinnön piiriä millään tavalla.

Esimerkki 1

Zymen tuottaminen 293-soluissa

Lyofilisoitu annos viljelmää E. coli pSZyme voidaan saada laboratorion Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Illinois, USA 61604 talletusnumerolla NRRL B-18971 ja käyttää suoraan viljelmänä alla kuvatussa menetelmässä. Tämä viljelme on talletettu kokoelmaan NRRL.

Plasmidi pSZyme eristettiin E. coli/pSZyme-viljelmästä cesiumkloridipuhdistuksen avulla. Plasmidia pSZyme pilkottiin sitten SalI:llä ja NotI:llä. Tulokseksi saatu fragmentti oli lineaarinen. Käytettiin DNA-ligaasia tämän SalI - NotI-fragmentin ja SalI - HindIII-liittäjän yhdistämiseen ligation avulla ennalta lineaarisesti tehtyyn pRc-plasmidiinTM. (Invitrogen, luettelo #V750-20).

Kompetentteja E. coli -soluja transfektoitiin sitten juuri aikaansaadulla pRc/Zyme-vektorilla, joka sisälsi SEQ ID NO:2:n, ja valittiin sellaisia soluja, jotka sisälsivät ampicilliiniresistenssigeenin, kasvattamalla ampicilliiniä sisältävällä kasvualustalla.

Sen jälkeen kun pRc/Zyme-vektori oli transfektoitu bakteeriin E. coli, suoritettiin seuraava plasmidien eristäminen pRc/Zyme-vektorin eristämiseksi. 293-solujen transfektoimiseksi pRc/Zyme-vektorilla käytettiin menetelmää, jonka ovat kehittäneet Chen ja Okayama. C. Chen ja H. Okayama, Molecular and Cellular Biology 7 (1987) 2745. Näitä soluja käytettiin soluviljelykokeessa kuten on kuvattu esimerkissä 2.

Valinta käyttäen antibioottia G418 (genetisiini) sisällytettiin tähän vaiheeseen stabiilien transformanttien tuottamiseksi 293-soluissa. Bakteeripesäkkeitä, jotka kasvoivat G418:n läsnä ollessa, käytettiin sitten Zymen lähteenä.

Esimerkki 2

Soluviljelykoe

Ihmisen sikiökautisia munuaissoluja (293-soluja) yhteistransfektoitiin pRcZymellä ja APP:n koodaavalla

vektorilla. Yhdessä tapauksessa vektori, joka koodasi 695 aminohapon APP:n (josta puuttuu Kunitz-tyyppinen domeeni), yhteistransfektoitiin pRcZymen kanssa. Toisessa tapauksessa vektori, joka koodasi 751 aminohapon APP:n (jossa on Kunitz-tyyppinen domeeni), yhteistransfektoitiin pRcZymen kanssa.

Transfektio suoritettiin käyttäen normaalia kalsiumfosfaattitransfektiota. Muut transfektio menetelmät kuten Sambrookin et al., yllä, kuvaamat ovat myös tehokkaita. Amyloidogeenisiä fragmentteja todettiin, kun käytettiin 695 aminohapon (ilman KPI) AAP:n koodaavaa sekvenssiä, Western blot -analyysin avulla kuten on kuvattu julkaisussa Sambrook et al., yllä, käyttäen APP-proteiinin karboksiterminaalisten aminohappojen vastaisia antiseerumeita. Anti-BX6, joka on kuvattu julkaisussa T. Oltersdorf et al., Journal of Biological Chemistry 265 (1991) 4492 - 4497, käytettiin tässä menetelmässä. Amyloidogeenisiä fragmentteja ei todettu, kun käytettiin 751 aminohapon (KPI:n kanssa) APP.

20 **Esimerkki 3**

HPLC-analyysi

Täysipitkä APP tuotetaan soluissa, jotka on infektoitu APP:n koodaavalla baculoviruksella. Tämä menetelmä suoritetaan J. Knopsin et al. mukaan, Journal of Biological Chemistry 266 (1991) 7285. APP:a inkuboidaan sitten aktiivisen Zymen ja koeyhdisteen läsnä ollessa. APP-fragmentit erotellaan sen jälkeen korkeapainenestekromatografian avulla. Kukin koottu fragmentti mikrosekvenssoidaan sitten käyttäen yleisiä menetelmiä kuten niitä, jotka on kuvattu teoksessa Hirs ja Timasheff, toimittajat, Methods in Enzymology, vol 91, kappaleet V ja VI (1983). Syntyneiden amyloidogeenisten fragmenttien (sellaisten, jotka päättyvät joko aminohappoon Met₅₉₆ tai aminohappoon Asp₅₉₇) määrää verrataan määrään, joka on syntynyt ilman koeyhdis-

tettä, jotta saataisiin määritettyä koeyhdisteen kyky vaikuttaa Zymeen.

Esimerkki 4

Zyme/kunitz-tyyppinen domeeni -kilpailuanalyysi

5 Syntetisoidaan peptidi, joka edustaa APP:n KPI-domeenia, ja merkitään se isotoopilla jodi-125 (^{125}I). Kilpaillevan sitoutumisen analyysijä suoritetaan sitten julkaisun J.P. Bennet ja H. Yamamura, Neurotransmitter Receptor Binding 61 (1985) mukaan. Zymeä sidotaan sitten muovisiin
10 mikrotiitterikuoppiin kuten tavanomaisessa ELISA-analyysissä. Yksi sellainen tyypillinen ohje tätä vaihetta varten on kuvattu julkaisussa F. Ausubel F., Current Protocols in Molecular Biology 2 (1989) 11.1 - 11.3. Radioaktiivisuudella merkittyä KPI-domeenia ja merkitsemätöntä
15 kilpailijayhdistettä lisätään sen jälkeen 96-kuoppaisen mikrotiitterilevyn kuoppiin. Kuopat pestään sitten. Jäljelle jääneen isotoopin määrä rekisteröidään, jotta saataisiin laskettua merkitsemättömän kilpailijayhdisteen suhteellinen affiniteetti Zymeä kohtaan.

Esimerkki 5

Genomikloonin eristäminen

Genomikirjasto, joka on spesifinen ihmisen kromosomi 19:n genomikirjastolle Charon 21A -bakteriofaagissa, hankittiin kokoelmasta the American Type Culture
25 Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA 20852, (ATCC) (luettelon numero 57711). Nämä faagit transfektoitiin E. coli K802 rec A⁻ -isäntäkantaan (luettelon numero 47 026). Faagin tiitteri oli $6,5 - 7,0 \times 10^4$ plakin muodostavaa yksikköä mikrolitraa kohti. Zymen koodaavan
30 geenin genomiklooni eristettiin käyttämällä tavanomaista faagikirjastojen seulontaa (katso esim. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2.6 - 2.114, 1989).

 Syntetisoitiin radioaktiivisuudella merkitty cDNA-koetin käyttäen polymeraasiketjureaktiota (kuten sitä,
35 jonka ovat kuvanneet Schowalter ja Sommer, Analytical

Biochemistry 177 (1989) 90 - 94) kiinnittämällä spesifisesti lämmitys-jäähdytyskäsittelyn avulla SEQ ID NO:5 ja SEQ ID NO:6 -alukkeita EcoRI/NotI- puhdistettuun (Bio-Rad Laboratories, P.O. Box 708, Rockville Centre, New York, USA, 11571, luettelon numero 732-6010) pRc-Zyme-DNA-fragmenttiin.

Hybridisointi ja pesu suoritettiin 65 °C:ssa kuten on kuvattu Zeta-ProbeTM-blotting-kalvon ohjekäsikirjassa (Bio-Rad, luettelon numero 164-0153). Oletettuja primäärinen Zyme -bakteriofaageja säilytettiin SM-puskuriliuoksessa, joka sisälsi 2 - 3 tippaa kloroformia. Yksi ainoa homogeeninen plakki (711-4) eristettiin myöhemmin kolmanesta seulonnasta. Lambda-bakteriofaagi-DNA:n, joka oli positiivinen paikan päällä tapahtuvassa Zymeen hybridisoitumisessa, eristäminen suoritettiin käyttäen yleisiä tekniikkoja.

Puhdistettua lambda-faagi-Zyme-DNA:ta pilkottiin HindIII:lla ja sille suoritettiin elektroforeesi käyttäen 1 % agarooosi/TBE (0,1 M Tris-HCl pH 8,3, 0,1 M boorihappo, 1 mM eteenidiamiinitetraetikkahappo) -geeliä. Eroteltu DNA siirrettiin sitten Zeta-ProbeTM-blotting-kalvolle (0,5 x TBE-ajopuskuriliuos, jatkuva 80 V 1 tunnin ajan) kuten on kuvattu Zeta-ProbeTM-ohjekäsikirjan kappaleessa 2.5, käyttäen denaturoimattomia olosuhteita ja sitten denaturoitiin (0,4 M NaOH 10 minuutin ajan) kuten on kuvattu Zeta-ProbeTM-ohjekäsikirjan kappaleessa 2.8.

Radioaktiivisuudella merkittyä koetinta, joka sisälsi pRc/Zymen BamHI/XbaI-fragmentin, käytettiin satunnaisaluke- DNA:n merkitsemistarvikkeiden kanssa (kuten niiden, jotka ovat kaupallisesti saatavissa toiminimeltä Boehringer Mannheim Corporation, 9115 Hague Road, P.O. Box 50414, Indianapolis, Indiana, USA 46250-0414, luettelon numero 1 004 760) tarkoituksessa määrittää, esiintyikö 3'-koodaava sekvenssi kloonissamme. Hybridisointi ja pesu yllä mainittuun Zeta-ProbeTM-kalvoon suoritettiin kuten on

kuvattu aikaisemmin, ja autoradiografia paljasti homologian Zymen 3'-alueen kanssa.

Tarkoituksessa varmistaa, että faagi 711-4 sisälsi 5'- Zymen koodaavan alueen, käytettiin jälleen polymeraasiketjureaktiota käyttäen SEQ ID NO:7 ja SEQ ID NO:8 470 emäsparin vyön monistamiseksi spesifisesti kolmannesta plakkipuhdistuksesta saadusta kromosomi 19 -Zyme-faagi-DNA:sta Kainzin et al. mukaan, Analytical Biochemistry 202 (1992) 46. Tämä DNA-fragmentti puhdistettiin ja subkloonnattiin sitten pUC-19-ilmentämisplasmidiin, joka on kuvattu yllä. Niiden DNA-sekvenssien identtisyys, jotka vastasivat 5'- Zyme-cDNA- koodaavan alueen sekvenssejä 1 - 33 ja lisäksi 272 nukleotidia vastavirtaan 5'- Zymen koodaavasta alueesta, varmistettiin DNA-sekvenssianalyysin avulla käyttäen yleisiä tekniikkoja.

Plasmiditalletuksia

Budapestin sopimuksen, joka koskee mikro-organismien tallettamisen patentin menetelmien tarkoituksia varten kansainvälistä tunnustamista, ehdoilla on seuraava viljelmä talletettu laitoksen the Northern Regional Research Center (NRRL), Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 61604, pysyvään viljelmäkokoonelmaan:

	Talletettu materiaali	Talletusnumero
25	<u>E. coli</u> K12/ pSZyme	NRRL B-18971

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä aminohappoyhdisteen, jolla on aminohapposekvenssi

[illegible]

joka alempana määritellään nimityksellä SEQ ID NO:1, tai sen funktionaalinen vastine, syntetisoimiseksi, t u n - n e t t u siitä, että ilmennetään mainitun aminohapposekvenssin koodaavaa nukleiinihappoyhdistettä olosuhteissa, 5 jotka ovat sopivat geenin ilmentymistä varten.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu nukleiinihappoyhdiste sisältää sekvenssin

10	ATGAAGAAGC TGATGGTGGT GCTGAGTCTG ATTGCTGCAG CCTGGGCAGA	50
	GGAGCAGAAAT AAGTTGGTGC ATGGCGGACC CTGCGACAAG ACATCTCACC	100
	CCTACCAAGC TGCCCTCTAC ACCTCGGGCC ACTTGCTCTG TGGTGGGGTC	150
	CTTATCCATC CACTGTGGGT CCTCACAGCT GCCCACTGCA AAAAACCGAA	200
	TCTTCAGGTC TTCCTGGGGA AGCATAACCT TCGGCAAAGG GAGAGTTCCC	250
15	AGGAGCAGAG TTCTGTTGTC CGGGCTGTGA TCCACCCTGA CTATGATGCC	300
	GCCAGCCATG ACCAGGACAT CATGCTGTTG CGCCTGGCAC GCCCAGCCAA	350
	ACTCTCTGAA CTCATCCAGC CCCTTCCCCT GGAGAGGGAC TGCTCAGCCA	400
	ACACCACCAG CTGCCACATC CTGGGCTGGG GCAAGACAGC AGATGGTGAT	450
	TTCCCTGACA CCATCCAGTG TGCATACATC CACCTGGTGT CCCGTGAGGA	500
20	GTGTGAGCAT GCCTACCCTG GCCAGATCAC CCAGAACATG TTGTGTGCTG	550
	GGGATGAGAA GTACGGGAAG GATTCTGCC AGGGTGATTG TGGGGGTCCG	600
	CTGGTATGTG GAGACCACCT CCGAGGCCTT GTGTCATGGG GTAACATCCC	650
	CTGTGGATCA AAGGAGAAGC CAGGAGTCTA CACCAACGTC TGCAGATACA	700
	CGAACTGGAT CCAAAAAACC ATTCAGGCCA AG	732

25 joka alempana määritellään nimityksellä SEQ ID NO:2, tai sen funktionaalisen vastineen tai osan.

3. Menetelmä Alzheimerin taudin tai alttiuden saada Alzheimerin tauti diagnosoimiseksi potilaalla, t u n - n e t t u siitä, että

30 a) hankitaan DNA:ta mainitulta potilaalta;
b) pilkotaan mainittua DNA:ta restriktioentsyymillä;

c) hybridisoidaan mainittu pilkottu DNA sellaisen merkityn nukleotidisekvenssin kanssa, joka vastaa patenttivaatimuksen 2 mukaista nukleiinihappoyhdistettä tai sen 35 osaa; ja

d) verrataan hybridisoitumismallia sellaisten luovuttajan perheen jäsenten, jotka osoittavat tai ovat osoittaneet Alzheimerin taudin oireita, samoin pilkotuihin ja hybridisoituihin vyökonfiguraatioihin.

5 4. Menetelmä sen seikan määrittämiseksi, onko koeaine patenttivaatimuksen 1 mukaisen SEQ ID NO:1:n mukaisen proteiinin funktionaalinen ligandi, t u n n e t t u siitä, että

10 a) saatetaan proteiini kosketuksiin mainitun koeaineen kanssa;

 b) tarkkaillaan proteiinin aktiivisuutta fysikaalisesti todettavissa olevan keinoon avulla ja

 c) identifioidaan sellaiset aineet, jotka ovat vuorovaikutuksessa proteiinin kanssa tai vaikuttavat sen
15 aktiivisuuteen verrattuna kontrolliin, johon ei lisätä koeainetta.

 5. Menetelmä sellaisen isäntäsolun aikaansaamiseksi, joka kykenee ilmentämään patenttivaatimuksen 2 mukaista yhdistettä, t u n n e t t u siitä, että transfektoidaan isäntäsolu nukleiinihappovektorilla, joka sisältää
20 patenttivaatimuksen 2 mukaisen yhdisteen.

 6. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen aminohapposekvenssin ilmentämiseksi patenttivaatimuksen 5 mukaisessa transfektoidussa isäntäsolussa, t u n n e t t u
25 siitä, että viljellään mainittua transfektoitua isäntäsolua olosuhteissa, jotka ovat sopivat geenin ilmentämistä varten.

 7. Menetelmä SEQ ID NO:1:n mukaisen aminohappoyhdisteen identifioimiseksi tai puhdistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että kyllästetään patenttivaatimuksen 6 mukaisen menetelmän proteiiniuute vasta-aineella, joka on
30 spesifinen SEQ ID NO:1:n mukaiselle yhdisteelle, poistetaan sitoutumaton vasta-aine ja puhdistetaan aminohappoyhdiste/vasta-ainekonjugaatti, mitä valinnaisesti seuraa
35 aminohappoyhdiste/vasta-ainekonjugaatin hajotus.