



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 322728

(13) B1

(51) Int Cl.

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 8/66 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19955110	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1994.06.20 PCT/IB94/00166
(22)	Inng.dag	1995.12.15	(85)	Videreføringsdag	1995.12.15
(24)	Løpedag	1994.06.20	(30)	Prioritet	1993.06.18, DK, 725/93
(41)	Alm.tilgj	1996.02.15			
(45)	Meddelt	2006.12.04			
(83)	Biol.mat. dep	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) nr. 8281, 8282			
(73)	Innehaver	Lennart Hansson, Björkvägen 50, 90728 UMEÅ, SE Torbjörn Egelrud, Generalsgatan 11, 90336 UMEÅ, SE			
(72)	Oppfinner	Lennart Hansson, Björkvägen 50, 90728 UMEÅ, SE Torbjörn Egelrud, Generalsgatan 11, 90336 UMEÅ, SE			
(74)	Fullmektig	Plougmann & Vingtoft, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, NO			

(54)	Benevnelse	Nukleotidsekvens kodende for rekombinant stratum corneum chymotryptisk enzym (SCCE), samt replikerbar ekspresjonsvektor, plasmid, vertscelle, fremgangsmåter, diagnostisk middel, sammensetninger og anvendelser derav.			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9319738, Egelrud T. et al., 1990 Arch.Dermatol. Res. vol283, s.108-112, Lundstrom A. et al. 1991. Acta Derm. Venerol. vol.71, s.471-474			
(57)	Sammendrag				

Et polypeptid med en aminosyresekvens SEQ ID NO: 2 eller en analog eller variant derav med SCCE aktivitet, som et polypeptid med en sekvens ifølge aminosyresekvens SEQ ID NO: 2 er beskrevet. Nukleotidsekvenser kodende for polypeptider med SCCE aktivitet samt ekspresjonssystemer, ekspresjonsvektorer, plasmider og ikke-humane organismer som omfatter nevnte nukleotidsekvenser er beskrevet. Et viktig aspekt er farmasøytiske midler, kosmetiske og hudbehandlingssammensetninger omfattende et polypeptid med SCCE aktivitet, og anvendelse av et polypeptid med SCCE aktivitet for behandling eller profylakse av forskjellige sykdommer så som acne, xeroderma eller andre hyperkeratotiske betingelser så som callositt og keratosis pilaris samt forskjellige ichtyoser, psoriasis og andre betennelseshudsykdommer så som eksem. Anvendelse av en forbindelse som har en inhibitorisk virkning på den enzymatiske aktiviteten til nativ SCCE for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling eller profylakse av autoimmune pemfigus sykdommer eller akantolytiske sykdommer så som familiær pemfigus og Darier sykdom er også beskrevet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en nukleotidsekvens kodende for polypeptidet, et ekspressjonssystem med evne til å uttrykke polypeptidet samt farmasøytiske og kosmetiske sammensetninger som omfatter polypeptidet, anvendelse av polypeptidet for forskjellige kosmetiske og terapeutiske formål, og fremgangsmåter derav.

Huden som et organ er av interesse for biologiske, medisinske og kosmetologiske synspunkter. Det er et stort antall hudsykdommer som er enten organ-spesifikke, for eksempel psoriasis og eksem, eller er manifesteringer av generell sykdom, så som generelle allergiske reaksjoner. Det faktum at det er hud-spesifikke sykdommer kan bli betraktet som et bevis på eksistensen av molekylære mekanismer som er unike for huden. Analogt er studier på hud-spesifikke molekylære prosesser av betydning for forståelsen og behandlingen av hudforstyrrelser. Det er rimelig å anta at flere av disse prosessene på en eller annen måte er relatert til den mest spesialiserte funksjonen til huden, dvs. dannelse av en fysisk-kjemisk barriere mellom kroppens ytre og indre. Den fysiske-kjemiske hudbarrieren er lokalisert i det ytterste hudlaget, stratum corneum.

Stratum corneum er den mest spesialiserte strukturen til huden. Det er sluttproduktet for differensieringsprosessen til epidermis, dvs. lagdelt skjellepitel som utgjør den ytterste delen av huden. Hoveddelen av cellene til epidermis består av keratinocytter i forskjellige differensieringstilstander. Laveste keratinocytter, basalcellene, ligger på en basalmembran i kontakt med epidermis som er bindevevet til huden, og er de eneste keratinocytene som har evne til deling. En fraksjon av basalcellene forlater kontinuerlig basalmembranen og går gjennom en differensieringsprosess som til slutt gjør at cellene blir byggestener til stratum corneum. I denne prosessen går keratinocytene gjennom et antall adaptive forandringer. Det er et øket innhold av cytoskjelett bestående av epidermis-spesifikke cytokeratiner. Mellomliggende filamenter til ved siden av liggende celler blir koblet til en funksjonell enhet ved et økende antall desmosomer. De mest dramatiske forandringene foregår i løpet av overgangen fra øverste levende cellelag, stratum granulosum, til ikke-levedyktig stratum corneum i en prosess som vanligvis blir kalt keratinisering. Kovalentlig kryssbundne proteiner blir deponert nære den indre delen av plasmamembranen og danner en meget motstandsdyktig cellekappe. En lipidrik forbindelse, med opphav i en keratinocyt-spesifikk celleorganelle, blir utskilt til det ekstracellulære området og ved dannelse av lipid lameller som omgir cellene til stratum corneum utgjør disse permeabilitetsbarrieren overfor hydrofile forbindelser. Alle intracellulære strukturer med unntak av tett pakke de cytokeratin filamenter forsvinner.

Cellene til stratum corneum, corneocyter, er følgelig ikke-levedyktige. Dette betyr at regulering av forskjellige prosesser i stratum corneum må være resultatet av en "programmering" ved et stadium der keratinocytene fortsatt er levedyktige.

Nedbrytningstiden til epidermis som vanligvis foregår i løpet av omtrent 4 uker hvor cellene er en del av stratum corneum i omtrent 2 uker blir avsluttet ved at cellene avgis fra hudoverflaten i prosessen betegnet avskalling. Denne prosessen er eksempel på "programmering" av stratum corneum. En forutsetning for funksjonen til stratum corneum som en fysio-kjemisk barriere er at dets individuelle celler blir holdt sammen av mekaniske resistente strukturer som er desmosomer. Degradering av desmosomene, som er en forutsetning for avskalling, må bli regulert slik at det oppnås en celleavgivelse fra hudoverflaten som balanserer den nye produksjonen av stratum corneum uten å interferere med barriere funksjonene til vevet.

Forstyrrelser ved keratinisering.

I et stort antall patologiske tilstander i huden med varierende alvorlighet er det underliggende forstyrrelser i den keratiniserende prosessen. I psoriasis er det i tillegg til en typisk kronisk betennelse, overproduksjon av et umodent stratum corneum som resulterer i den typiske skjelldannelsen ved denne sykdommen. Det er en gruppe arvede hudsykdommer karakterisert ved et fortykket stratum corneum som fører til dannelsen av "fiske skjell", såkalte ichthyoser. I flere av ichthyosene er det en redusert avskallingsrate. Til tross for at det er mindre alvorlig enn ichthyoser er "tørr hud" (xeroderma) også karakterisert ved et stratum corneum hvor corneocyter blir avgitt, ikke som under normale betingelser som enkeltceller eller som små aggregater av celler, men som store, makroskopiske synlige flak. Denne forstyrrelsen er meget vanlig blant eldre mennesker og blant atopiske personer, dvs. individer med en redusert motstand mot hudirritasjoner og en tilbøyelighet til å utvikle en karakteristisk form for endogen eksem. I acne sykdommer er det en forstyrret keratinisering i kanalene i sebaceous kjertlene som fører til dannelsen av comedoner og plugger. Dannelsen av comedoner kommer først og er antatt å utløse acne betennelsessår.

Proteolytiske enzymer er involvert i keratinisering

Det er flere stadier i keratiniseringsprosessen og i løpet av nedbrytningen til stratum corneum hvor proteolytiske enzymer ser ut til å spille viktige roller. Fjerning av alle
5 intracellulære strukturer med unntagelse av cytokeratinfilamenter som oppstår i løpet av overgangen mellom levedyktige og forhornede epidermale lag, må involvere proteolyse. Overføring av profilaggrin til filaggrin, et protein som antas å virke i spesielle typer av aggregasjon av cytokeratinfilamenter i løpet av keratinisering, kan bli katalysert av en spesifikk proteinase. I stratum corneum blir filaggrin ytterligere degradert til
10 komponenter med lav molekylvekt som sannsynligvis er viktige som "naturlige fuktighetsmidler". Det er videre proteolytiske modifikasjoner av cytokeratin polypeptider i løpet av keratiniseringsprosessen. Proteolytiske hendelser spiller sannsynligvis viktige roller ved degradering av intercellulære kohesive strukturer i stratum corneum i prosesser som til slutt fører til avskalling.

15

Stratum corneum cellekohesjon og avskalling. Rollen til desmosomer

Intercellulær kohesjon i stratum corneum samt i levedyktige deler av epidermis blir formidlet i stor grad av desmosomer. Et desmosom består av to symmetriske halvdel
20 som hver er dannet av to tilgrensende celler. Hver desmosomal halvdel har en intracellulær del koblet til cytokeratinfilamentene og en del dannet av glykoproteiner forankret intracellulært og med transmembranale og ekstracellulære deler. De ekstracellulære delene til disse proteinene, desmogleiner, er adhesjonsmolekyler, og gjennom deres interaksjon med hverandre i det ekstracellulære rommet blir en kohesiv
25 struktur dannet. Degradering av desmosomer ser ut til å følge noe forskjellige veier i stratum corneum i håndbaken og hælene sammenlignet med ikke-palmo-plantar stratum corneum. I det sistnevnte vev forsvinner rundt 85% av desmosomene like etter at cellene er blitt fullstendig forhornede. De gjenværende desmosomene som er fortrinnsvis lokalisert ved de trevlede kantene av de ekstremt flate cellene forblir sannsynligvis
30 intakt opp til et nivå hvor avskallingen foregår. I palmo-plantar stratum corneum er corneocytene mye mindre flate og det er ingen omfattende degradering av desmosomer i de dypere lagene til vevet. I begge vevene er avskallingen assosiert med desmosomal degradering. I ichtiotisk hud samt i "tørr hud" er antall desmosomer i de kunstige lagene til stratum corneum blitt vist å være forøkte.

35

Stratum corneum intercellulære lipider

Forskjellen i desmosomal degradering mellom palmo-plantar og ikke-palmo-plantar stratum corneum kan være relatert til forskjellen i mengder av ekstracellulære lipider i de to vevstypene. Lipidinnholdet er betraktelig høyere i ikke-palmo-plantar stratum corneum. Dette kan korreleres med effektiviteten til dette vevet som en permeabilitetsbarriere overfor vann og andre hydrofile forbindelser er bedre i forhold til stratum corneum i håndbaken og hælene. På grunn av at desmosomer okkuperer betydelig volum og intakte desmosomer forhindrer en utvidelse av det ekstracellulære rommet, kan desmosomal degradering være en mekanisme hvorved mere ekstracellulært område blir gjort tilgjengelig for lipidene. Ekstracellulære lipider til stratum corneum er relatert til avskalling på flere måter. På grunn av at de er de vesentlige bestanddelene av det ekstracellulære området kan det være ventet at de har viktig innvirkning på aktivitetene til enzymer som virker ved denne beliggenheten, for eksempel enzymer ansvarlige for desmosomal degradering. Forskjellige forstyrrelser i lipidmetabolismen har blitt vist å være de sannsynlige årsakene til flere typer av ichthyoser. Det er også sannsynlig at lipidene selv bidrar i noen grad til stratum corneum cellekohesjon. Sekresjon av lipider til stratum corneum ekstracellulært område er sannsynligvis assosiert med sekresjon også av et antall enzymer. Forløpere til lipider blir lagret i de øvre levedyktige (ovenfor og nedefor "viable") keratinocyter i spesifikke organeller. Disse såkalte lamellære legemene er blitt vist å inneholde et antall hydrolytiske enzymer. Det antas derfor at et enzym ansvarlig for desmosomal degradering i stratum corneum gir syntetisert, muligens i en inaktiv pro-form, av keratinocyter, lagret i de lamellære legemene og utskilt til stratum corneum ekstracellulært område i løpet av keratiniseringen hvor det kan bli aktivert og dets aktivitet videre regulert av, blant andre faktorer, sammensetningen til de ekstracellulære lipidene.

Forstyrrelser ved cellekohesjon i levedyktig epidermis

Det er et antall hudsykdommer hvor det er redusert kohesjon mellom keratinocyter i ikke-forhornede, levedyktige epidermal lag. Disse sykdommene er karakterisert ved hjelp av et fenomen betegnet acantholysis, som er en nedbrytning av desmosomale kontakter mellom ellers tilsynelatende normale keratinocyter. Prosessen blir sannsynligvis formidlet av proteinaser som frem til nå ikke er blitt fullstendig identifisert. Acantholysis, som når den er omfattende fører til dannelsen av blemmer, er karakteristisk for den autoimmune sykdommen pemphigus vulgaris og pemphigus

foliaceus, arvelig benign familiær pemphigus (Hayley-Hayley's sykdom) og arvelig dyskeratosis follicularis (Darriers sykdom).

Epidermis tar en aktiv del i immunologiske og betennelsesreaksjoner

5

I tillegg til dets funksjon som produsent av den fysiske-kjemiske barrieren mellom kroppens indre og ytre virker epidermis også som en aktiv immunologisk barriere. Keratinocytter har evnen til å produsere og også reagere overfor et stort antall cytokiner og andre inflammatoriske mediatorer som de kommuniserer gjennom og reagerer med celler fra immunologiske og inflammatoriske systemer. Dette er av stor viktighet ved 10 vertsforsvaret overfor mikrobielle infeksjoner og ved leging av sår. Moderne forskning har også vist at keratinocytter sannsynligvis spiller en aktiv del i mange inflammatoriske hudsykdommer så som psoriasis og eksem.

15 *Epidermale proteinaser kan være viktige i betennelse*

En av cytokinene produsert av keratinocytter er interleukin 1 (IL-1). IL-1 eksisterer i to former, IL-1 α og IL-1 β , og begge er til stede i epidermis. IL-1 α er fullstendig aktiv som syntetisert, mens IL-1 β blir syntetisert som en inaktiv 31 kD pro-form. Pro-IL-1 β blir 20 omdannet til aktiv 17 kD formen av en spesifikk proteinase som for eksempel er til stede i monocyter, men ikke enda detektert i normal epidermis. Et antall serinproteinaser med chymotrypsin-lignende substrat spesifisitet (bukspyttkjertel chymotrypsin og cathepsin G til neutrofile granulocytter) kan derimot også virke som pro-IL-1 β aktivatører.

25

Som foreslått av Norris (1990), kan proteolytiske enzymer tilstede i stratum corneum intracellulære området under visse betingelser ha evne til å omdanne inaktive former av cytokiner til aktive former. Av spesiell interesse i denne sammenheng er biologisk inaktiv pro-interleukin-1 β som er blitt vist å bli produsert av keratinocytter (Mizutani et 30 el., 1991). Frem til nå er det ikke blitt oppdaget epidermale enzymer med evne til å omdanne pro-interleukin-1 β til aktiv interleukin-1 β . På grunn av at chymotrypsin og cathepsin G (et chymotrypsin-lignende enzym) har evnen til å katalysere omdanningen av inaktiv 31 kD rekombinant pro-interleukin 1 β til en fullstendig aktiv 31 kD form er det mulig at også epidermale chymotrypsin-lignende enzymer kan katalysere denne 35 omdanningen.

WO93/19732 angår et protein ekstrahert fra grisehud. Det er ingen dokumentasjon i søknaden på at ekstraktet inneholder stratum corneum chymotryptisk enzym.

- 5 Egelrud T. et al., 1990, Arch. Dermatol. Res. vol 283, s. 108 - 112 og Lundström A. et al., 1991, Acta Derm. Venereol. vol 71, s. 471 - 474 angår et protein med en ukjent aminosyresekvens. Molekylvekten på 18Da rapportert i Egelrud et al., 1990, er forskjellig fra den som er rapportert i den foreliggende søknaden (25kDa under ikke-reduserende betingelser og 28kDa under reduserende betingelser).
- 10 Foreliggende oppfinnelse vedrører nukleotidsekvenser til et enzym som er blitt betegnet stratum corneum chymotryptisk enzym (SCCE) som antas å være ansvarlig for desmosomal degradering i stratum corneum. Bevis er presentert i eksempel 1 som viser at celleavgivelse fra overflaten til forhornet overflatelag til huden innbefatter degradering av desmosomale proteiner og at det ansvarlige enzymet ser ut til å være i en
- 15 chymotrypsin-lignende serinproteinase som kan bli inhibert av sinkioner.

Eksempel 2 beskriver oppdagelsen av stratum corneum chymotryptisk enzym (SCCE); en proteinase som oppfyller kriteriene som omfatter å være ansvarlig for degradering av intracellulære kohesive strukturer i stratum corneum in vitro og muligens også in vivo.

- 20 Eksempel 3 beskriver delvis karakterisering av stratum corneum chymotryptisk enzym (SCCE) aktivitet ved anvendelse av kromogene substrater.

- Resultatene demonstrerer at SCCE er forskjellig enzymologisk i forhold til andre chymotryptiske proteinaser. Inhibitorprofilen og evnen til å degradere to forskjellige
- 25 substrater av chymotrypsin-lignende enzymer er betydelig forskjellig for SCCE sammenlignet med bovin chymotrypsin og human cathepsin G. SCCE ser også ut til å være forskjellige fra human mastcelle chymase. Sistnevnte enzym katalyserer degradering av Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA effektiv (se Schwartz et al., 1987 og Schechter et al., 1989) - i det SCCE ikke gjør det, og blir ikke inhibert av aprotinin eller
- 30 SBTI (Schechter et al., 1983 og Wintroub et al., 1986) som SCCE blir.

- Eksempel 4 beskriver delvis rensing av SCCE fra HCl-ekstrakter til corneocyter ved hjelp av affinitetskromatografi på usolubilisert soyabønnetrypsin inhibitor (SBTI) og bestemmelse av den N-terminale aminosyresekvensen til SCCE. Med ureduserte prøver
- 35 var utbyttet godt i trinnene 1-6, men falt til 0 i trinnene 7 og 9 og utbyttene i påfølgende trinn ble betydelig redusert. Også med reduserte prøver var det ikke mulig å detektere aminosyederivater i trinnene 7 og 9, men i påfølgende trinn hvor derivater kunne bli

detektert var det ingen dype fall i utbyttene. Disse resultatene tyder på at det er cysteiner i posisjonene 7 og 9. Det var derimot ikke mulig å detektere karboksymetyleret cystein i trinnene 7 og 9 etter reduksjon og behandling med jodeddiksyre (100 mM). Sekvensen oppnådd (fig. 13, SEQ ID NO: 3) var identisk for reduserte og ureduserte prøver.

5

Eksempel 5 beskriver preparering av SCCE-spesifikke monoklonale antistoffer og polyklonale SCCE-spesifikke kylling og kanin antistoffer samt immunohistokjemiske studier med monoklonale antistoffer.

- 10 Eksempel 6 beskriver kloning og sekvensering av et cDNA kodende for human SCCE. Opprinnelig ble et cDNA bibliotek dannet fra mRNA avledet fra voksne humane keratinocyter med epidermal opprinnelse screenet med anti-SCCE kanin polyklonale antistoffer. Et av antistoffene ga et høyt bakgrunnssignal og ble ekskludert fra den omfattende screeningsstudien ved et tidlig tidspunkt. Ved anvendelse av et annet
- 15 polyklonalt antistoff (D-5) ble et antall immunreaktive plakk anrikt som for sanne positive plakk. Ingen reaktivitet med monoklonale antistoffer moAb 4 og moAb 9 ble derimot observert for noen av plakkene. En omfattende restriksjonsenzym-karakterisering og PCR karakterisering av elleve isolerte plakk viste at ingen likheter mellom forskjellige plakk kunne bli detektert. Basert på denne manglende evnen til å
- 20 definere et "fingeravtrykk" av en sannsynlig SCCE cDNA sekvens måtte strategien bli modifisert.

Til tross for den foretrukne deteksjonen av SCCE immunoreaktivt materiale i suprabasale keratinocyter ble et cDNA bibliotek dannet fra dyrkede humane

25 keratinocyter anvendt for screening av SCCE cDNA. Et slikt bibliotek kan ventes å inneholde cDNA fra bare basale keratinocyter. Dette forsøket var basert på observasjonen om at en svak, men sannsynligvis signifikant immunofarving ved anvendelse av SCCE monoklonale antistoffer også av basale keratinocyter.

- 30 Plakkene ble screenet ved anvendelse av en syntetisk 17-mer oligonukleotid probe konstruert på grunnlag av den mest pålitelige delen av aminosyresekvensen Ile-Ile-Asp-Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 10, aa 1 - aa 6) av den eksperimentelt bestemte amino-terminale sekvensen til nativt SCCE enzym som beskrevet i eksempel 4. På grunn av usikkerheten i den eksperimentelt bestemte aminosyresekvensen ble dette heksapeptidet
- 35 vurdert å representere en av de mest levedyktige delene. I tillegg resulterte de mulige kodonene kodende for dette heksapeptidet i den lavest mulige degenerering av DNA proben. Den lengre eksperimentelt bestemte sekvensen Gln-Val-Ala-Leu-Leu-Ser-Gly-

Asn-Gln-Leu (SEQ ID NO: 3); aa 14 - aa 24) ble ekskludert på grunn av høy grad av degenerering av en sekvens kodende for denne peptidsekvensen. 14 positive plakk ble identifisert i den primære screeningen. Disse positive plakkene ble screenet på nytt ved anvendelse av samme probe og metode som beskrevet ovenfor. Etter den nye
5 screeningsprosedyren ble to positive plakk identifisert. De to selekterte plakkene ble rensset en gang til og størrelsen av innskuddene ble bestemt ved PCR ved anvendelse av SYM 1600 og SYM 1601, som var komplementære med to fagarmer, som primere og isolerte fag som templat. Dette klonede fragmentet ble utsatt for en delsekvens analyse.

10

Translasjon av den oppnådde DNA sekvensen resulterte i en aminosyresekvens som var homolog med den eksperimentelt bestemte proteinsekvensen. Sekvensen manglet derimot et translasjonsstartkodon. For å isolere et full-lengde cDNA ble det oppnådde DNA fragmentet separert på agarosegel og anvendt som en probe som muliggjør
15 hybridisering under stringente betingelser. For å oppnå et full-lengde cDNA ble et cDNA bibliotek på ny screenet to ganger med denne proben ved anvendelse av de samme metodene som beskrevet ovenfor, med unntagelse av at hybridiseringen var under stringente betingelser, ved 65°C. Disse eksperimentene resulterte i identifikasjon og isolering av 45 individuelle, positive plakk som ble opprinnelig screenet ved PCR
20 analyser ved anvendelse av SYM 1600 eller SYM 1601 i kombinasjon med SYM 3208 som PCR primere for identifikasjon av et plakk inneholdende hele 5' åpen leseramme.

Etter ytterligere screening og sekvensanalysering ble de resulterende PCR amplifiserte fragmentene oppnådd fra disse plakkene klonet som beskrevet i detalj i eksempel 6 og
25 resultatene indikerte at en av fagene, 205.2.1, inneholdt et full-lengde innskudd. Den fullstendige nukleotidsekvensen til cDNA fragmentet ble bestemt. Nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 1) inneholdt en åpen leseramme tilstrekkelig for å kode for hele aminosyresekvensen til et SCCE forløperprotein bestående av 253 aminosyrer inkludert et signapeptid og et prepolypeptid (SEQ ID NO: 2).

30

Eksempel 7 beskriver deteksjonen i human epidermis av to SCCE mRNA-arter som kan hybridisere med cDNA prober dannet på grunnlag av en SCCE cDNA sekvens.

Eksempel 8 beskriver ekspresjon av rekombinant SCCE i *E. coli*. Resultatene viser at
35 det er mulig å produsere rekombinant SCCE i bakterier.

Eksempel 9 beskriver ekspresjonen av rekombinant human SCCE i pattedyrceller. Tre proteiner som viser reaksjonen med alle tilgjengelige polyklonale kanin og kylling SCCE antistoffer samt med deponerte monoklonale antistoffer blir produsert.

5 Rekombinante proteiner som er reaktive med antistoffer dannet mot nativ SCCE viser en tilsynelatende molekylvekt som er omtrent 1 kDa større enn rensset nativ human SCCE. Det rekombinante proteinet viser ikke proteolytisk aktivitet.

Rensing, aktivering og ytterligere karakterisering av rekombinant SCCE er beskrevet i eksempel 10. Den inaktive pro-formen av rekombinant SCCE kan bli aktivert ved
10 proteolytisk spaltning med trypsin eller endopeptidase Lys-C. Det blir antatt at et antall andre proteaser som spalter et peptid etter en basisk aminosyre, så som endoproteinase Lys-C, papain og plasmin, vil ha evnen til å aktivere pro-SCCE til aktiv SCCE. Det har blitt oppdaget at signalpeptidet består av 22 aminosyrer og basert på den N-terminale aminosyresekvensen til nativ aktiv SCCE, består propeptidet av 7 aminosyrer. Det er
15 videre vist at produsert rekombinant SCCE består av 2 N-glykosylerte former og en ikke-glykosylert form som er analog med resultatene oppnådd med aktiv nativ SCCE.

Med betegnelsen "stratum corneum chymotryptisk enzym (SCCE)" eller "et polypeptid med SCCE aktivitet" betyr i bredeste aspekt en serin protease eller en proform derav, så
20 som et proenzym (pro-SCCE) eller et fusjonsprotein som kan bli aktivert ved proteolytisk spaltning, i det nevnte enzym i dets aktive form blir inhibert av de samme inhibitorene og på en lignende måte som spontan celledissosiasjon som kan bli induert i modellsystemer med prøver av forhornede lag av huden inkubert ved nøytral eller nær nøytral pH ved fysiologisk temperatur.

25 Betegnelsen "et polypeptid med SCCE aktivitet" definerer følgelig et polypeptid som er forskjellig fra chymotrypsin og cathepsin G og som i dets aktive form har evne til å dekomponere forbindelsen MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA (S-2586) i det dekomponeringen av polypeptidet blir inhibert av aprotinin, chymostatin og sinksulfat
30 vesentlig som beskrevet i eksempel 3 og 13 og illustrert i fig. 9 og tabell 5.

Betegnelsen "et polypeptid med SCCE aktivitet" omfatter et polypeptid som har evne til å forårsake proteolytisk degradering av desmosomalt protein desmoglein I i løpet av in vitro inkubasjon av plantar stratum corneum.

35 Et slikt polypeptid vil generelt også reagere med antistoffer dannet mot nativ SCCE som er blitt rensset fra et ekstrakt av dissosiert plantar stratum corneum celler. Eksempler på

slike antistoffer er polyklonale antistoffer produsert som beskrevet i 5.2 og monoklonale antistoffer TE4b og TE9b produsert som beskrevet i eksempel 5.1. De monoklonale antistoffene blir produsert av hybridomene TE4b og TE9b deponert ved European Collection of Animal Cell Cultures, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom, under aksesjonsnummerene ECACC 93061817 og ECACC 93061816, i henhold til reglene ifølge Budapest avtalen.

Kloning og sekvensering av et cDNA kodende for human SCCE er beskrevet i eksempel 6. En nukleotid sekvens inneholdende en åpen leseramme som tilstrekkelig koder for hele aminosyresekvensen til et SCCE forløperprotein består av 253 aminosyrer inkludert et signalpeptid og et prepolypeptid er blitt oppdaget. Nukleotidsekvensen er vist i SEQ ID NO: 1 og den utledede aminosyresekvensen til "stratum corneum chymotryptisk enzym (SCCE)" er vist i SEQ ID NO: 2.

Med betegnelsen "pro-SCCE eller en analog eller variant derav" menes et polypeptid som har aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 2 eller en analog eller variant av nevnte sekvens som blir produsert når en nukleotidsekvens ifølge oppfinnelsen blir uttrykt i et egnet ekspresjonssystem og som vevsproteolytisk aktivering gir opphav til en serin proteinase som kan bli inhibert av de samme inhibitorene som spontan celledissosiasjon som kan bli induert i modellsystemer ved prøver av forhornede hudlag inkubert ved nøytral eller nær nøytral pH ved fysiologisk temperatur, dvs. omtrent 37°C. Proteinene vil generelt reagere med antistoffer dannet mot rensset nativ eller rekombinant SCCE.

Med betegnelsen "en SCCE eller en analog eller variant derav" menes et polypeptid med aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2 eller en analog eller variant av nevnte sekvens som blir produsert når en nukleotidsekvens ifølge oppfinnelsen blir uttrykt i et egnet ekspresjonssystem og som er en serin proteinase og kan bli inhibert av samme inhibitorer som spontan celledissosiasjon som kan bli induert i modellsystemer med prøver av forhornede lag av hud inkubert ved nøytral eller nær nøytral pH ved fysiologisk temperatur, dvs. omtrent 37°C. Proteinene vil reagere med antistoffer dannet mot rensset nativ eller rekombinant SCCE.

Med betegnelsen "en analog eller variant derav" menes følgelig et polypeptid som ikke har den nøyaktige aminosyresekvensen vist i SEQ ID NO: 2, men som fortsatt har "SCCE aktivitet" som definert ovenfor. Generelt vil slike polypeptider være polypeptider som for eksempel varierer i en viss grad i aminosyresammensetning, eller

post-translasjonelle modifikasjoner som for eksempel glykosylering eller fosforylering, sammenlignet med SCCE proteinet beskrevet i eksemplene.

Betegnelsen "analog" eller "variant" blir følgelig anvendt i foreliggende sammenheng for å indikere et protein eller polypeptid med en lignende aminosyresekvens eller sekvens som karakteristisk aminosyresekvens SEQ ID NO: 2 avledet fra SCCE proteinet som beskrevet i eksempel 1, med muligheter for mindre variasjoner som endrer aminosyresekvensen, for eksempel delesjoner, setespesifikke mutasjoner, innskudd av ekstraaminosyrer eller kombinasjoner derav, for å danne SCCE proteinanaloger. Disse modifikasjonene kan gi interessante og nyttige nye egenskaper til analogen. Analogpeptid eller proteinet kan bli avledet fra et dyr eller et menneske eller kan være av delvis eller fullstendig syntetisk opprinnelse. Analogen kan også bli oppnådd ved anvendelse av rekombinante DNA teknikker.

En viktig utførelsesform er følgelig et polypeptid hvor minst ett aminosyreresidie er blitt erstattet med et annet aminosyreresidie og/eller hvor minst et aminosyreresidie er blitt deletert eller tilsatt slik at det resulterer i et polypeptid som omfatter en aminosyresekvens som er forskjellig fra aminosyresekvensen vist i SEQ ID NO: 2 eller en subsekvens av nevnte aminosyresekvens som definert nedenfor, men som vesentlig har SCCE aktivitet som definert ovenfor.

En interessant utførelsesform vedrører et polypeptid som er en analog eller subsekvens av polypeptidet ifølge oppfinnelsen omfattende fra 50 til 250 aminosyrer, for eksempel minst 70 aminosyrer, minst 100 aminosyrer, minst 150 aminosyrer eller minst 200 aminosyrer.

Spesielt viktige utførelsesformer er polypeptidet som har aminosyresekvensen -7-224 i SEQ ID NO: 2 (pro-SCCE) og polypeptidet med aminosyresekvensen 1-224 i SEQ ID NO:2 (SCCE).

Betegnelsen "enzymatisk aktiv subsekvens" angir en polypeptidsekvens som bare omfatter en del av polypeptidsekvensen vist i SEQ ID NO: 2 og som har enzymatisk aktivitet. Innbefattet er også polypeptidsubsekvenser som er blitt analogisert ved modifikasjoner som beskrevet heri. Det spesifikke polypeptidet (eller polypeptidene) som omfatter enzymatisk aktivt sete er betraktet å være av spesiell interesse.

Antatt aminosyresekvens SEQ ID NO:2 er blitt sammenlignet med aminosyresekvensen til enzymene human chymotrypsin (Toulta et al., 1989), human cathepsin G (Salvesen et al., 1987) og human mastcelle chymase (Caughey et al., 1991). Til tross for at den utledede aminosyresekvensen inneholder konserverte aktive regioner av serin proteaser

5 er graden av homologi meget lav, omtrent 33-38%. I dette henseendet ser det følgelig ut til at SCCE bare har moderat likhet med tidligere kjente serinproteinaser. Derimot er SCCE en typisk serinproteinase når det gjelder histidin, aspartat og serinresidier til det aktive setet og konserverte regioner nære opp til disse setene. Dette er også tilfellet når det gjelder de fleste cysteinresidiene og andre høyt konserverte regioner av

10 serinproteinaser. I bunnen av den primære spesifikke "pouch" (residie 189 i chymotrypsin) er det et serinresidie i human chymotrypsin, mastcellechymase og prostat-spesifikk antigen og et alaninresidie i human cathepsin G. I SCCE derimot er det i denne posisjonen et asparaginresidie. Dette forklarer funnet som omfatter at til tross for at SCCE har chymotryptisk aktivitet er den relative aktiviteten overfor forskjellige

15 kromogene peptidsubstrater forskjellig fra chymotrypsin og cathepsin G, samt den inhibitoriske effektiviteten til chymostatin, en inhibitor med lav molekylvekt av chymotrypsin-lignende enzymer.

En sammenligning mellom sekvensene til human chymotrypsin, human cathepsin G og

20 human mastcelle chymase og den til SCCE er vist i følgende oppstilling av sekvensene.

SCCE I IDGAPCARGSHPWQVALLSGNQLHH . . . CGGVLVNERWVLTAAHC²KMN
HUMCTRP I VNGEDAVPGSWPWQVSLQDKTGPHF . . . CGGSLISEDWVVTA²AHCGVR
HUMCHTG I IGGRESRPHSRPYMAYLQIQSPAGQS . RCGGFLVREDFVLTAAHCWGS
HUMCHYM I IGGTECKPHSRPYMAYLEIVTSNGPSKFCGGFLIRRNFVLTAAHCAGR
20 50

SCCE EYTV . . HLGSDTLGDRRA . . QRIKASKSFR . HPGYSTQTHVNDLMLVKLN
HUMCTRP TSDVVVAGEFDQGSDEENI . QVLKIAKVKF . NPKFSILTVNNDITLLKLA
HUMCHTG NINV . . TLGAHNIQRRENT . QOHITARRAIRHPQYNORTIQNDIMLLQLS
HUMCHYM SITV . . TLGAHNITEEEDTWQKLEVIKQF . RHPKYNTSTLHHDIMLLKLK
80

SCCE SQARLSSMVKKVRLPSRC . . E . . PPGTTCTVSGWGTTTSPDVTFPSDLMC
HUMCTRP TPARFSQTVSAVCLPSADDDF . . PAGTLCATTGWGKTKYNANKTPDKLQQ
HUMCHTG RRVRRNRNVNPVALPRAQ . . EGLRPGTLCTVAGWGRVSMRRGTDTLREVO
HUMCHYM EKASLTLAVGT . . LPFPSQFNFPVPPGRMCRVAGWGRTGVLPKPGSDTLQEV
110 140

SCCE VDVKLISPODCTEVYKDLENSMLCAGIPDSKQNA . CNGDSGGPLVCRGT
HUMCTRP AALPLLSNAECKKSWGRRITDVMICAGA . . . GVSS . CMGDSGGPLVCOKD
HUMCHTG LRVQRDRQ . . CLRIFGSYDPRRQICVGDRRERKA²AFK . GDSGGPLL²CNNV
HUMCHYM KLRLMDPOA . CSHFRDFDENL . QLCVGNPRKTKSAFK . GDSGGPLL²CAGV
170 200

SCCE LQ . . . GLVSWGTFPCGO . PNDP²GVYTQVCKFTKWINDTMKKHR
HUMCTRP GAWTLVGIVSWGSDTCST . SS . PGVYARVTKLIPWVQKILAAN
HUMCHTG AH . . . GIVSYGKSSGVP . . . P²EVFTRVSSFLPWIRTTMRSFKLLDOMETPL
HUMCHYM AQ . . . GIVSYGRSDAKP . . . PAVFTRISHYRPWINQILQAN
230

HUMCTRP = human chymotrypsin (Touita et al., BBRC 158:569-575, 1989)

HUMCHTG = human cathepsin G (Salvesen et al., Biochemistry 26:2289-2293, 1987)

HUMCHYM = human mast celle chymase (Caughey et al., J. Biol. Chem. 266:12956-12963, 1991)

5

Homologier:

HUMCTRP/SCCE: 85/224 = 38%

HUMCHTG/SCCE: 74/224 = 33%

HUMCHYM/SCCE: 74/224 = 33%

10 HUMCHTG/HUMCHYM: 109/226 = 48%.

Nummereringen refererer til chymotrypsinogen

Understrekingene:

15 konserverte regioner nær aktive sete (Ile 15, His 57, Asp 102, Ser 194 i chymotrypsin) og primære spesifisitetsslommen til chymotrypsin (Ser 189, Ser 213-Trp 215, Gly 226 i chymotrypsin).

Stjerner: mulig N-glykosyleringssete i SCCE

20

En viktig utførelsesform vedrører følgende et polypeptid med en aminosyresekvens hvor en tilstøtende tråd på 20 aminosyrer er homolog i en grad på minst 80% med en tråd av aminosyrer med samme lengde valgt fra aminosyresekvensen vist i SEQ ID NO: 2.

25 Polypeptidsekvensen som har en homologi på minst 80% så som minst 85%, for eksempel 90%, med polypeptidet vist i SEQ ID NO: 2 utgjør viktige utførelsesformer. I det sekvensen vist i SEQ ID NO: 2 ser ut til å være meget unik omfatter rammen av oppfinnelsen polypeptider hvor graden av homologi med en lignende påfølgende tråd på 20 aminosyrer valgt fra aminosyresekvensen vist i SEQ ID NO: 2 behøver ikke å være

30 mer enn 50%, til tross for at det er foretrukket at den ikke er mer enn 70%. Slike sekvenser kan bli avledet fra lignende proteiner fra andre arter, for eksempel andre pattedyr så som mus, rotte, kanin, marsvin, gris eller ku. I det mindre deler av sekvensen kan vise betraktelige likheter med andre serinproteaser omfatter rammen av oppfinnelsen også peptider med en grad av homologi på minst 95%, og mest foretrukket

35 minst 99% homologi med en lignende påfølgende tråd med 20 aminosyrer valgt fra aminosyresekvensen vist i SEQ ID NO: 2.

Med betegnelsen "sekvenshomologi" menes identiteten i sekvensen til aminosyrer i segmenter på to eller flere aminosyrer som tilsvarer med hensyn på identitet og posisjon av aminosyrene til polypeptidene.

- 5 Betegnelsen "homolog" illustrerer graden av identitet mellom aminosyresekvensen til et gitt polypeptid og aminosyresekvensen vist i SEQ ID NO: 2. Aminosyresekvensen som skal bli sammenlignet med aminosyresekvensen vist i SEQ ID NO: 2 kan bli utledet fra en nukleotidsekvens så som en DNA eller RNA sekvens, for eksempel oppnådd ved hybridisering som definert i det følgende, eller kan bli oppnådd ved konvensjonelle
- 10 aminosyresekvenseringsmetoder. Grad av homologi blir fortrinnsvis bestemt på aminosyresekvensen til et modent polypeptid, dvs. uten å betrakte noen ledersekvens. Generelt blir bare kodende regioner anvendt ved sammenligning av nukleotidsekvenser for å bestemme deres indre homologi.
- 15 I foreliggende sammenheng angir betegnelsen "polypeptid som blir gjenkjent av minst et av de deponerte antistoffene" en aminosyresekvens som omfatter aminosyrene som utgjør et vesentlig påfølgende område med hensyn på lineær eller romlig konformasjon til en hvilken som helst subsekvens av polypeptidet vist i SEQ ID NO: 2 som blir gjenkjent av minst en av de deponerte antistoffene. Som velkjent innenfor dette
- 20 fagområdet kan også sekundære eller tertiære konformasjoner ha interessante og nyttige egenskaper og kan utgjøre epitoper. De deponerte antistoffene TE4b og TE9b ser ut til å gjenkjenne konformasjonsepitopene til SCCE.

Det er blitt vist at et polyklonalt kaninantistoff dannet som beskrevet i eksempel 5.2.2

25 produserte en granulær farving av stratum granulosum og en heller diffus farving av lavere stratum corneum i immunofluoresens mikroskopi. Antistoffer dannet mot renset nativ eller rekombinant SCCE vil generelt bli bundet til suprabasale celler i keratiniserte (forhornede) humane skjellepitel, men ikke overfor epitelceller i ikke-forhornede skjellepitel. Disse antistoffene vil også bli bundet til intercellulært område til det

30 forhornede laget i human hud.

Antistoffer som er reaktive med polypeptidene ifølge oppfinnelsen er egnede for et antall formål som er oppført i det følgende:

- 35 For rensing av proteiner: antistoffene kan bli anvendt for å rense polypeptidene eller analogene derav fra biologiske prøver ved anvendelse av affinitetskromatografi eller immunpresipiteringsteknikker.

For diagnostikk og terapi: monoklonale antistoffer mot polypeptidene eller analogene kan bli anvendt i diagnostikk og terapi i sykdomstilstander i dyr og mennesker. Det diagnostiske middelet kan være et antistoff med spesifisiteten for polypeptidet ifølge oppfinnelsen. Antistoffet kan bli koblet til et annet protein eller en fast bærer og/eller kan bli anvendt i agglutineringsstester eller farveutviklingstester. Slike antistoffer kan også bli anvendt for å kvantifisere SCCE polypeptider eller analoger derav i biologiske prøver ved anvendelse av standardhistokjemi eller immunokjemiteknikker.

10 Foreliggende oppfinnelse omfatter en nukleotidsekvens, kjennetegnet ved at den koder for et polypeptid som i dets aktive form er i stand til å dekomponere substratet MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA (S-2586), dekomponeringen ved polypeptidet blir inhibert av aprotinin, chymostatin og sinksulfat, og hvor polypeptidet:

- 15 a) har en aminosyresekvens som har en identitet på minst 80% med aminosyresekvensen 1 – 224 i Seq. Id. Nr. 2;
- b) har en aminosyresekvens fra hvor en konstitutiv rekke av 20 aminosyrer er identiske til en grad av minst 95% med en rekke av aminosyrer med samme lengde valgt fra aminosyresekvensen vist i Seq. Id. Nr. 2; eller
- 20 c) er en subsekvens av polypeptidet i a) som omfatter fra 50 til 250 aminosyrer.

I et annet aspekt vedrører oppfinnelsen en nukleotidsekvens med nukleotidsekvensen vist i SEQ ID NO: 1 eller en analog eller subsekvens derav som har en identitet med sekvensen vist i SEQ ID NO: 1 på minst 90%.

25 Innenfor rammen av foreliggende oppfinnelse er det også en modifisert nukleotidsekvens som er forskjellig fra en nukleotidsekvens som definert ovenfor ved at minst ett nukleotid er blitt deletert, substituert eller modifisert eller minst et ytterligere nukleotid er blitt skutt inn slik at det resulterer i en nukleotidsekvens som koder for et polypeptid med SCCE aktivitet. I foreliggende beskrivelse og krav angir betegnelsen "subsekvens" en sekvens som fortrinnsvis har en størrelse på minst 15 nukleotider, mere foretrukket minst 18 nukleotider og mest foretrukket er minst 21 nukleotider. I et antall utførelsesformer ifølge oppfinnelsen vil subsekvensen eller analogen til nukleotidsekvensen ifølge oppfinnelsen omfatte minst 48 nukleotider, slik at minst 75 nukleotider eller minst 99 nukleotider. "Subsekvensen" bør oppfylle minst ett av kriteriene ovenfor eller bør hybridisere med nukleotidsekvensen vist i SEQ ID NO: 1.

Det er velkjent at små fragmenter er nyttige i PCR teknikker som beskrevet heri. Slike fragmenter og subsekvenser kan blant andre anvendelser bli anvendt som prober for identifikasjon av mRNA fragmentene til nukleotidsekvensen ifølge oppfinnelsen som beskrevet i eksempel 7.

5

Betegnelsen "analog" med hensyn til DNA fragmentene ifølge oppfinnelsen skal indikere en nukleotidsekvens som koder for et polypeptid som er identisk eller vesentlig identisk med polypeptider som blir kodet av et DNA fragment ifølge oppfinnelsen. Det er velkjent at samme aminosyre kan bli kodet av forskjellige kodoner, i det kodonbruken er relatert, interalia, til preferansen av gjeldende organismer som uttrykker nukleotidsekvensen. En eller flere nukleotider eller kodoner av DNA fragmentet ifølge oppfinnelsen kan bli erstattet av andre som når uttrykt resulterer i et polypeptid identisk eller vesentlig identisk med polypeptider som blir kodet av DNA fragmentet.

15 Betegnelsen "analog" blir anvendt i foreliggende oppfinnelse for å indikere et DNA fragment eller en DNA sekvens med en lignende nukleotidsammensetning eller sekvens som karakteristisk DNA sekvens SEQ ID NO: 1 kodende for aminosyresekvensen som utgjør SCCE polypeptider, med mulighet for mindre variasjoner som ikke har en signifikant negativ virkning på den enzymatiske aktiviteten til analogen sammenlignet med aktiviteten til nativt SCCE protein som beskrevet i eksempel 3. Med betegnelsen "signifikant negativ effekt" menes at den enzymatiske aktiviteten til analogen bør være minst 50%, mere foretrukket er minst 60%, ytterligere mere foretrukket er minst 70% så som minst 75% av den enzymatiske aktiviteten til nativ SCCE, når bestemt for eksempel som beskrevet i eksempel 3. Det analoge DNA fragmentet eller DNA 25 sekvensen kan bli avledet fra en organisme så som et dyr eller et menneske eller kan være av delvis eller fullstendig syntetisk opprinnelse. Analogen kan også bli oppnådd gjennom anvendelse av rekombinante DNA teknikker.

Betegnelsen "analog" og "subsekvens" skal innbefatte variasjoner i sekvensen så som substitusjon, innskudd (inkludert introner), addisjon og rearrangement av en eller flere nukleotider, i det variasjonene ikke har noen vesentlig negativ virkning på polypeptidet som blir kodet av DNA fragmentet eller en subsekvens derav. 30

Betegnelsen "substitusjon" skal bety erstatning av en eller flere nukleotider i hele nukleotidsekvensen med en eller flere forskjellige nukleotider, "addisjon" skal bety addisjon av en eller flere nukleotider i en av endene til hele nukleotidsekvensen, "innskudd" skal bety innføring av en eller flere nukleotider innenfor hele 35

nukleotidsekvensen, "delesjon" skal indikere at en eller flere nukleotider er blitt deletert fra hele nukleotidsekvensen enten det er ved en hvilken som helst ende av sekvensen eller ved et hvilke som helst egnet punkt deri, og "rearrangement" skal bety at to eller flere nukleotidresidier er blitt ombyttet i DNA eller polypeptidsekvensen. DNA fragmentet kan derimot også bli modifisert ved mutagenese enten før eller etter innskudd inn i organismen.

Betegnelsene "fragment", "sekvens", "subsekvens" og "analog" som anvendt i foreliggende beskrivelse og krav med hensyn på fragmenter, sekvenser, subsekvenser og analoger ifølge oppfinnelsen skal selvfølgelig forstås som at de ikke omfatter disse fenomenene i deres naturlige miljø, men for eksempel i isolert, rensset, in vitro eller rekombinant form.

I en utførelsesform ifølge oppfinnelsen kan deteksjon og/eller kvantifisering av SCCE polypeptid mRNA bli oppnådd ved ekstrahering av RNA fra cellene eller vevene og omdanning derav til cDNA for påfølgende anvendelse i polymerasekjedereaksjon (PCR). PCR primerene kan bli syntetisert basert på et DNA fragment ifølge oppfinnelsen så som DNA fragmentet vist i SEQ ID NO: 1. Denne metoden for deteksjon og/eller kvantifisering kan bli anvendt som en diagnostisk metode for diagnostisering av en sykdomstilstand hvor et SCCE mRNA blir uttrykt i høyere eller lavere mengder enn normalt.

Også innenfor rammen av foreliggende oppfinnelse er et diagnostisk middel som omfatter en nukleotidprobe som kan detektere en nukleotidsekvens ifølge oppfinnelsen samt en metode for diagnostisering av sykdommer hvor SCCE ekspresjonen er deregulert og/eller sykdommene hvor SCCE genet er mutert, omfatter å utsette en prøve fra en pasient som antas å ha en sykdom hvor en høyere mengde av SCCE enn normalt er tilstede eller en mutert form av SCCE, for en PCR analyse hvor prøven blir kontaktet med et diagnostisk middel som beskrevet ovenfor, som muliggjør at en hvilken som helst nukleotidsekvens blir amplifisert og bestemmelse av tilstedeværelse av eventuelle identiske eller homologe nukleotidsekvenser i prøven.

Polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan bli produsert ved anvendelse av rekombinant DNA teknologi. En viktig utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse vedrører et ekspresjonssystem som omfatter en nukleotidsekvens ifølge oppfinnelsen.

Organismen som blir anvendt for produksjon av polypeptidet kan være en høyere organisme, for eksempel et dyr, eller en lavere organisme, for eksempel en mikroorganisme så som E. coli. Uansett type av organisme som blir anvendt blir DNA fragmentet ifølge oppfinnelsen introdusert inn i organismen enten direkte eller ved hjelp
5 av en egnet vektor. Alternativt kan polypeptidene bli produsert i pattedyrcellelinjer ved innføring av DNA fragmentet eller en analog eller en subsekvens derav ifølge oppfinnelsen enten direkte eller ved hjelp av en ekspresjonsvektor.

DNA fragmentet eller en analog eller en subsekvens derav kan også bli klonet i en egnet
10 stabil ekspresjonsvektor og deretter plassert inn i en egnet cellelinje. Cellene som produserer ønskede polypeptider blir deretter selektert basert på nivå av produktiviteten under betingelser egnede for vektoren og cellelinjen som blir anvendt. Selekterte celler blir dyrket videre og danner en meget viktig og kontinuerlig kilde for ønskede polypeptider.

15 Et eksempel på en spesifikk analog av DNA sekvensen ifølge oppfinnelsen er en DNA sekvens som omfatter DNA sekvensen vist i SEQ ID NO: 1 eller en del derav og som er spesielt tilpasset for ekspresjon i E. coli. Denne DNA sekvensen resulterer når skutt inn i E. coli sammen med egnede regulatoriske sekvenser til ekspresjon av et polypeptid
20 som har vesentlig aminosyresekvensen vist i SEQ ID NO: 2 eller en del derav. Denne DNA sekvensen omfatter følgelig spesifikke kodoner som blir gjenkjent av E. coli. Et eksempel på denne utførelsesformen er beskrevet i eksempel 8.

I denne sammenhengen blir betegnelsen "gen" anvendt for å indikere en DNA sekvens
25 som er involvert i produksjon av et polypeptidkjede og som innbefatter regioner som går forut for og etterfølger den kodende regionen (5'-oppstrøms- og 3'-nedstrømssekvenser) samt mellomliggende sekvenser, introner, som blir plassert mellom individuelle kodende segmenter, eksoner eller i 5'-oppstrøms- eller 3'-nedstrøms regionen. 5'-oppstrømsregionen omfatter en regulatorisk sekvens som kontrollerer ekspresjonen av
30 genet, vanligvis en promoter. 3'-nedstrøms regionen omfatter sekvenser som er involvert i terminering av transkripsjonen av genet og valgfrie sekvenser ansvarlige for polyadenylering av transkriptet og 3'-uttranslaterte regionen.

Oppfinnelsen vedrører et ekspresjonssystem som omfatter en nukleotidsekvens som
35 beskrevet ovenfor kodende for et polypeptid ifølge oppfinnelsen og systemet omfatter en 5'-flankerende sekvens med evne til å formidle ekspresjon av nevnte nukleotidsekvens.

Oppfinnelsen vedrører spesielt en replikerbar ekspresjonsvektor som inneholder og har evne til å formidle ekspresjon av en nukleotidsekvens ifølge oppfinnelsen. En spesifikk utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse vedrører en replikerbar

5 ekspresjonsvektor betegnet pS507 som er blitt deponert 11. mai 1993 til collection of Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) under aksjonsnummer DSM 8282 i henhold til Budapest avtalen, og ekspresjonsvektorer som uttrykker nukleotidsekvenser som er forskjellig fra nukleotidsekvensen til nevnte deponerte ekspresjonsvektor, men som koder for samme polypeptid eller analog eller

10 variant derav som har SCCE aktivitet.

Med andre ord omfatter rammen av oppfinnelsen også en replikerbar ekspresjonsvektor som beskrevet ovenfor, hvor nukleotidsekvensen som blit uttrykt er en som er forskjellig fra nukleotidsekvensen til den deponerte vektoren ved at minst et nukleotid

15 er blitt deletert, substituert eller modifisert eller minst et ytterligere nukleotid er blitt skutt inn for å resultere i en nukleotidsekvens som koder for et polypeptid med SCCE aktivitet.

Oppfinnelsen vedrører videre et plasmid betegnet pS500 som er blitt deponert 11. mai

20 1993 til collection of Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) under aksjonsnummer DSM 8281 i henhold til Budapestavtalen, og plasmider med nukleotidsekvensen som er forskjellig fra nukleotidsekvensen vist i SEQ ID NO: 1, men som koder for polypeptidet vist i SEQ ID NO: 2 eller en analog eller variant derav som har SSCE aktivitet, eller som hybridiserer med nukleotidsekvensen

25 vist i SEQ ID NO: 1 eller en del derav under stringente hybridiseringsbetingelser.

Innenfor rammen av foreliggende oppfinnelse er også en ikke-human organisme som inneholder et ekspresjonssystem ifølge oppfinnelsen. Organismene kan bli anvendt i dette aspektet av oppfinnelsen og omfatter en mikroorganisme så som en bakterie av

30 slekten Bacillus Escherichia eller Salmonella, en gjær så som Saccharomyces, Pichia, en protozoan, eller celle avledet fra en multicelleulær organisme så som en sopp, en insektscelle, en plantecelle, en pattedyrscelle eller en cellelinje. Dersom organismen er en bakterie er det foretrukket at bakterien er fra slekten Escherichia, for eksempel E. coli.

35 Oppfinnelsen omfatter videre en plasmidvektor inneholdende en DNA sekvens kodende for et polypeptid ifølge oppfinnelsen eller et fusjonspolypeptid som definert heri. I en spesielt viktig utførelsesform kan DNA fragmentet eller en analog eller subsekvens

derav ifølge oppfinnelsen eller et fusjons DNA fragment ifølge oppfinnelsen som definert heri blir utført av en replikerbar ekspresjonsvektor som har evne til å replikere i en vertsorganisme eller en cellelinje.

- 5 Vektoren kan være et plasmid, en fag, en kosmid, et mini-kromosom eller virus. I en interessant utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse kan vektoren være en vektor som når innført i en vertscelle blir integrert i vertens cellegenom.

Dersom en høyere organisme blir anvendt kan transgene teknikker bli anvendt for produksjon av polypeptider. Eksempler på egnede dyr er sau, kyr, griser, osv. Et DNA fragment kodende for et polypeptid ifølge oppfinnelsen blir uttrykt i det ønskede vevet under kontroll av vevsspesifikke regulatoriske elementer. Det resulterende proteinet kan deretter bli utsatt for post-translasjonelle modifikasjoner for å oppnå polypeptidet ifølge oppfinnelsen.

15

Transgene ikke-humane pattedyr blir produsert ved innføring av et "transgen" inn i en embryonal målcelle til det valgte dyret. Et transgen er en DNA sekvens som har evne for å produsere en ønsket fenotype når innbefattet i genomet til cellene til et transgent ikke-humant pattedyr. Transgenet omfatter en DNA sekvens kodende for et polypeptid, idet transgenet har evne for å bli uttrykt for å produsere polypeptidet.

20

Inkorporering av ekspresjonssystemet i kimlinjen til pattedyret kan bli utført ved anvendelse av hvilke som helst av de kjente teknikkene for eksempel som beskrevet i Hogan et al., 1986 eller i WO 93/04172.

25

I et spesielt aspekt av oppfinnelsen kan nukleotidsekvensen ifølge oppfinnelsen omfatte en annen nukleotidsekvens kodende for et polypeptid som er forskjellig fra eller identisk med polypeptidet ifølge oppfinnelsen koblet i ramme til en nukleotidsekvens ifølge sekvensen vist i SEQ ID NO: 1 eller en analog derav kodende for et SCCE polypeptid med det formålet av å produsere et koblet polypeptid i det polypeptidet utgjør et ytterligere interessant aspekt ifølge oppfinnelsen se for eksempel eksempel 8. Ved anvendelse av rekombinant DNA teknologi kan de koblede DNA sekvensen bli skutt inn i en egnet vektor eller et genom. Alternativt kan en av nukleotidsekvensene bli skutt inn i vektoren eller genomet som allerede inneholder den andre nukleotidsekvensen. Et fusjonspolypeptid kan også bli dannet ved innskudd av de to nukleotidsekvensene separat og muliggjøre at ekspresjon oppstår. Vertsorganismen som kan være av eukaryot eller prokaryot opprinnelse, blir dyrket under betingelser som forsikrer ekspresjon av

35

koblede sekvenser. Det koblede polypeptidet blir deretter rensset og polypeptidet ifølge oppfinnelsen blir separert fra fusjonspartneren ved anvendelse av en egnet metode.

Et aspekt av oppfinnelsen vedrører følgelig en fremgangsmåte for å produsere et polypeptid omfattende følgende trinn:

- (a) innskudd av en nukleotidsekvens ifølge oppfinnelsen inn i en ekspresjonsvektor,
- (b) transformering av en egnet vertsorganisme med vektoren produsert i trinn (a),
- (c) dyrking av vertsorganismen produsert i trinn (b) under egnede betingelser for uttrykking av polypeptidet,
- (d) høsting av polypeptidet og
- (e) eventuelt utsette polypeptidet for post-translasjonell modifikasjon.

Innenfor rammen av foreliggende oppfinnelse er også en fremgangsmåte som beskrevet ovenfor hvor polypeptidet som blir produsert blir isolert ifølge en metode som omfatter en eller flere trinn som affinitetskromatografi ved anvendelse av immobilisert nativt eller rekombinant SCCE polypeptid eller antistoffer reaktive med nevnte polypeptid og/eller andre kromatografiske og elektroforetiske prosedyrer.

Polypeptidet produsert som beskrevet ovenfor kan bli utsatt for post-translasjonelle modifikasjoner som et resultat av termisk behandling, kjemisk behandling (formaldehyd, glutaraldehyd osv.) eller enzymbehandling (peptidaser, proteinaser og proteinmodifikasjonszymer). Polypeptidet kan bli prosessert i et antall måter når produsert i en organisme sammenlignet med dets naturlige produksjonsmiljø. Som et eksempel blir glykosylering ofte oppnådd når polypeptidet blir uttrykt av en celle fra en høyere organisme så som gjær eller fortrinnsvis et pattedyr. Glykosylering finnes vanligvis i sammenheng med aminosyreresidene Asn, Ser, Thr eller hydroksylisin. Det kan være fordelaktig å fjerne eller endre prosesseringskaraktertrekkene som blir forårsaket av vertsorganismen.

Etter ekspresjon ifølge oppfinnelsen av polypeptidet i en organisme eller en cellelinje kan polypeptidet enten bli anvendt som det er eller det kan først bli rensset fra organismen eller cellelinjen. Dersom polypeptidet blir uttrykt som et utskilt produkt kan

det bli rensset direkte. Dersom polypeptidet blir uttrykt som et assosiert produkt kan det kreve delvis eller fullstendig ødeleggelse av verten før rensing. Eksempler på prosedyrer anvendt for rensing av polypeptider er: (i) immunopresipitering eller affinitetskromatografi med antistoffer, (ii) affinitetskromatografi med en egnet ligand, (iii) andre kromatografi prosedyrer så som gelfiltrering, ionebytte eller høy ytelse væskekromatografi eller derivater av hvilke som helt av det ovennevnte, (iv) elektroforetiske prosedyrer som polyakrylamidgelelektroforese, denaturerende polyakrylamidgelektroforese, agarosegelektroforese og isoelektrisk fokusering, (v) hvilke som helst andre spesifikke solubiliserings- og/eller rensningsteknikker.

10

Polypeptidet kan bli rensset som beskrevet i eksempel 4 ved SBTI affinitetskromatografi eller ved affinitetskromatografi på et immobilisert antistoff, så som antistoff TE4b, ifølge prosedyrer kjent for fagfolk innenfor dette området. En høy renhet til polypeptidet kan være fordelaktig når polypeptidet skal bli anvendt i en farmasøytisk eller kosmetisk sammensetning. Også på grunn av den høye renheten kan det vesentlig rene polypeptidet bli anvendt i en lavere mengde enn et polypeptid med en konvensjonelle lavere renhet.

15

I et aspekt av foreliggende oppfinnelse kan det rene polypeptidet bli oppnådd fra en egnet cellelinje som uttrykker et polypeptid ifølge oppfinnelsen som beskrevet i eksempel 9. Et polypeptid kan også bli dannet ved hjelp av velkjente metoder som væske eller fast fase peptidsyntese ved anvendelse av suksessiv kobling av individuelle aminosyrer av polypeptidsekvensen. Alternativt kan polypeptidet bli syntetisert ved kobling av individuelle aminosyrer som danner fragmenter av polypeptidsekvensen som senere blir koblet for å resultere i det ønskede polypeptidet. Disse metodene utgjør følgelig et annet interessant aspekt av oppfinnelsen.

25

Et meget viktig aspekt av foreliggende oppfinnelse vedrører en farmasøytisk sammensetning, en kosmetisk sammensetning eller en sammensetning for hudbehandling omfattende et polypeptid med SCCE aktivitet og en farmasøytisk og/eller kosmetisk akseptabel eksipient. Sammensetningen kan omfatte rensset nativt protein eller et rekombinant polypeptid eller et proenzym eller en fusjonsproteinform av polypeptidet som kan bli aktivert ved proteolytisk spaltning. Proenzymformen av polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan bli ansett som et "promedikament", dvs. en forbindelse som ved hensiktsmessig proteolytisk spaltning blir omdannet til aktiv form.

35

Foreliggende oppfinnelse vedrører spesielt sammensetninger egnede for topisk applikasjon, for eksempel applikasjon på hud.

Farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen egnede for topisk administrering kan være kremer, salver, vann, geler, oppløsninger, suspensjoner, pasta, pinner, spray, shampoo, såper, hårbehandlingsmidler eller pulvere.

5

Topisk administrering kan være en administrering på eller nære de delene av kroppen som representerer de patologiske forandringene det her gjelder, for eksempel på en ytre del av kroppen så som hudoverflaten. Applikasjonen kan være en enkel påsmøring ved sammensetningen, eller kan involvere en hvilken som helst innretning egnet for å forsterke etablering av kontakt mellom sammensetningen og de patologiske lesjonene så som anvendelse av tettende belegg, for eksempel tettende plasterytstyre med sammensetningen ifølge oppfinnelsen. Sammensetningene kan bli impregnerert eller fordelt på biter, plasteryt, strimler, gassbind, svampmaterialer, bomullsstykker osv. Eventuelt kan en form for injeksjon av sammensetningen inn i eller nære lesjonene bli anvendt.

15

Topiske sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse kan omfatte 1-80 vekt-% av den aktive forbindelsen basert på totalvekten av preparatene, så som 0.001-25 vekt-% av den aktive forbindelsen, for eksempel 0.1-10%, 0.5-5% eller 2-5%. Mer enn en aktiv forbindelse kan bli inkorporert i sammensetningen, dvs. sammensetninger omfattende SCCE, pro-SCCE eller en SCCE inhibitor i kombinasjon med andre farmasøytiske og/eller kosmetiske forbindelser hører også inn under rammen av oppfinnelsen. Sammensetningen blir hensiktsmessig påført 1-10 ganger pr dag avhengig av type, alvorligheten og lokalisering av sårene.

25

For topisk applikasjon kan preparatet bli formulert i henhold til konvensjonell farmasøytisk praksis med farmasøytiske eksipienter som vanligvis blir anvendt for topiske applikasjoner. Naturen til bæreren anvendt i preparatet av en hvilken som helst bestemt sammensetning vil avhenge av metoden for administrering av sammensetningen. Bærere forskjellige fra vann som kan bli anvendt i sammensetningene kan innbefatte faste stoffer eller væsker så som bløtgjøringsmidler, oppløsningsmidler, fuktemidler, fortykningsmidler og pulvere. Eksempler på hver av disse bærertypene som kan bli anvendt enten alene eller som blandinger av en eller flere bærere, er som følger: bløtgjøringsmidler, så som stearyl alkohol, glycerol monoricinoleat, glyceryl monostearat, propan-1,2-diol, butan-1,3-diol, cetylalkohol, isopropyl isostearat, stearinsyre, isobutylpalmitat, isocetylstearat, oleylalkohol, isopropyllaurat, heksyl laurat, decyloleat, oktadekan-2-ol, isocetylalkohol, cetylpalmitat,

35

dimetylpolysiloksan, di-n-butyl sebacat, isopropylmyristat, isopropylpalmitat, isopropylstearat, butylstearat, polyetylen glykol, trietylen glykol, lanolin, lakserolje, acetylte lanolin alkoholer, petroleum, mineralolje, butylmyristat, isostearinsyre, palmitinsyre, isopropyllinoleat, lauryllaktat, myristyllaktat, decyloleat, myristylmyristat;

5

bløtgjøringsmidler, så som vann, metylenklorid, isopropanol, lakserolje, etylen glykolmonoetyler, dietylen glykolmonobutyleter, dietylen glykolmonoetyler, dimetylsulfoksid, tetrahydrofuran, vegetabiliske og animalske oljer, glycerol, etanol, propanol, propylen glykol og andre glykoler eller alkoholer, fikserte oljer;

10

fuktemidler eller bløtningsmidler, så som glycerin, sorbitol, natrium 2-pyrrolidon-5-karboksyilat, oppløselig collagen, dibutylftalat, gelatin;

pulvere, så som kritt, talk, kaolin, stivelse og derivater derav, gummier, colloidal silisiumdioksid, natriumpolyakrylat, kjemisk modifisert magnesiumaluminiumsilikat, 15 hydret aluminium silikat, karboksyvinylpolymer, natriumkarboksymetylcellulose, etylen glykolmonostearat;

geldannende eller svellende midler, så som pektin, gelatin og derivater derav, 20 cellulosederivater så som metylcellulose, karboksymetylcellulose eller oksidert cellulose, cellulosegummi, guar gummi, acacia gummi, karaya gummi, tragacanth gummi, bentonit, agar, alginater, karbomer, gelatin, bladderwrack, ceratonia, dekstran og derivater derav, ghatti gummi, kektorit, ispaghula husk, xanthan gummi; polymerer, så som polymelkesyre eller polyglykolsyre polymerer eller kopolymerer derav, parafin, 25 polyetylen, polyetylenoksid, polyetylen glykol, polypropylen glykol, polyvinylpyrrolidon;

overflateaktive midler, så som ikke-ioniske overflate aktive midler, for eksempel glykol og glycerol estere, makrogoletere og estere, sukkeretere og estere, så som sorbitanestere, ioniske overflateaktive midler, så som aminsåper, metalliske såper, sulfaterte 30 fettalkoholer, alkyletersulfater, sulfaterte oljer og amfolytiske overflate aktive midler og lecitiner;

Bufningsmidler, så som natrium, kalium, aluminium, magnesium eller kalsiumsalter (så som klorid, karbonat, bikarbonat, citrat, glukonat, laktat, acetat, gluceptat eller tartrat).

35

For topisk applikasjon kan pH til sammensetningen i prinsippet være innenfor et bredt område så som 3-9. I en foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen blir en pH hvor

en egnet proteolytisk aktivitet av polypeptidet blir oppnådd, for eksempel en pH på omtrent 4 til 8 foretrukket. Konvensjonelle buffringsmidler som beskrevet ovenfor kan bli anvendt for å oppnå ønsket pH.

- 5 Preparatet ifølge oppfinnelsen kan også inneholde andre additiver så som stabiliseringsmidler, konserveringsmidler, oppløsningsmidler, färvemidler, chelaterende midler, geldannende midler, salvebaser, pH-regulatorer, anti-oksydanter, parfymet og hudbeskyttelsesmidler osv. Dersom sammensetningen er i form av en shampoo eller såpe kan sammensetningen videre omfatte skumdannende midler, perledannende midler
10 og/eller kondisjoneringmidler.

Vanlige konserveringsmidler innbefatter parabener, formaldehyd, Kathon CG, Bronidox, Bronopol, p-klor-m-kresol, klorheksidin, benzalkoniumklorid osv.

- 15 Konvensjonelle ingredienser kan bli anvendt hvor sammensetningene ifølge oppfinnelsen er i form av en shampoo eller en såpe, og vanlige såpe og shampoo grunnlag innbefatter komponenter som betaine, natriumlaurylsulfat, nonylfenol, imidazol, sulfosuccinat, gjentetningsmidler, fuktighetsmidler og kondisjonierende midler.

20

Det kan videre være fordelaktig å tilveiebringe modifiserte frigjøringspreparater hvor den aktive forbindelsen blir inkorporert inn i en polymermatrise, eller nanopartikler, eller liposomer eller miceller, eller adsorbent på ionebytteharpikser, eller båret på en polymer.

25

Sammensetningene kan bli formulert ifølge konvensjonell farmasøytisk praksis og kan utgjøre:

halvfaste formuleringer: geler, pastaer, blandinger.

30

Flytende formuleringer: oppløsninger, suspensjoner, store doser, emulsjoner.

- En farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen kan omfatte et polypeptid eller et funksjonelt derivat derav, eller en kombinasjon av slike forbindelser. Eksempler på
35 egnede funksjonelle derivater innbefatter farmasøytiske akseptable salter, spesielt de som er egnede for anvendelse i et kutant miljø. Eksempler innbefatter farmasøytiske akseptable salter av aminofunksjonen, for eksempel salter med syrer som tilveiebringer

anioner som er farmasøytisk akseptable, spesielt i et kutant miljø. Eksempler innbefatter fosfater, sulfater, nitrat, iodid, bromid, klorid, borat samt anioner avledet fra karboksylsyrer innbefattende acetat, benzoat, stearat osv.

- 5 Andre derivater av aminofunksjonen innbefatter amider, imider, urea, karbamater osv.

Andre egnede derivater innbefatter derivater av karboksylgruppen til et polypeptid, inkludert salter, estere og amider. Eksempler innbefatter salter med farmasøytiske akseptable kationer, for eksempel litium, natrium, kalium, magnesium, kalsium, sink, 10 aluminium, ferro, jernholdig, ammonium og lavere (C₁₋₆)-alkylammoniumsalter. Estere innbefatter lavere alkylestere.

Eksempler på sammensetninger i eksempel 11 illustrerer eksempler på farmasøytiske, kosmetiske og hudbehandlingsformuleringer ifølge foreliggende oppfinnelse, men skal 15 ikke på noen måte begrense rammen av sammensetningene ifølge oppfinnelsen.

Kosmetiske sammensetninger eller hudbehandlingssammensetninger omfattende nativ eller rekombinant SCCE er aktive mot akne, xeroderm eller andre hyperkeratotiske tilstander så som callositis og keratosis pilaris. Det er forskjellige stadier i akne vulgaris. 20 Det antas at det er nyttig å administrere SCCE i stadier hvor det er en forstyrret keratinisering i kanalene til talgkjertlene som fører til dannelsen av comedoner og plugging mens det kan være fordelaktig å administrere en forbindelse som inhiberer SCCE i stadier hvor en inflammatorisk aknelesjon er det dominante trekket.

25 Basert på vitenskapelig funn som angitt ovenfor, blir det antatt at farmasøytiske sammensetninger omfattende nativ eller rekombinant SCCE er nyttige for behandling eller profylakse av forskjellige ichtyoser, akne, psoriasis eller andre inflammatoriske hudsykdommer så som eksem med hyperkeratosis, mikrobielle infeksjoner og sårleging, spesielt når påført topisk.

30

Et annet aspekt av oppfinnelsen vedrører anvendelse av et polypeptid med SCCE aktivitet for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling eller profylakse av forskjellige ichthyoser, akne, psoriasis eller andre inflammatoriske hudsykdommer med hyperkeratosis så som eksem.

35

Oppfinnelsen kan danne grunnlag for en fremgangsmåte for behandling og/eller forhindring av forskjellige ichthyoser, akne, psoriasis eller andre inflammatoriske

hudsykdommer med hyperkeratoser så som eksem, fremgangsmåter omfattende administrering til en pasient som trenger dette en terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde av et polypeptid med SCCE aktivitet. Behandling kan være profylaktisk, lindrende eller legende.

5

Det blir betraktet at et "kaskade system" av proteolytiske enzymer eksisterer i det kutane miljøet som er lik plasminogenaktiveringssystemet. SCCE antas å være et av sluttproduktene i dette systemet. Det blir betraktet at aktiviteten til SCCE kan bli inhibert ved hjelp av en "SCCE inhibitor".

10

I et antall hudsykdommer, så som autoimmun pemfigus sykdom eller akantolytiske sykdommer, for eksempel familiær pemfigus og Darriers sykdom, er det manglende kohesjon mellom keratinocytter i ikke-forhornet levedyktig epidermallag (se forstyrrelser av cellekohesjon i levedyktig epidermis). Det antas at denne prosessen blir formidlet av proteinaser og følgelig at den kan bli behandlet ved administrering av en forbindelse som har evne til å inhibere den enzymatiske aktiviteten til nativ SCCE. Det kan også være fordelaktig å administrere en SCCE inhibitor for behandling av psoriasis eller andre inflammatoriske hudsykdommer i tilstander hvor en inflammatorisk komponent er det viktigste trekket.

20

Følgelig kan det tenkes anvendelse av en SCCE inhibitor som har en inhibitorisk virkning på den enzymatiske aktiviteten til nativ SCCE for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling eller profylakse av autoimmune pemfigus sykdommer eller acantholytiske sykdommer så som familiær pemfigus og Darriers sykdom.

25

I denne sammenhengen refererer betegnelsen "SCCE inhibitor" til en eksisterende eller ny forbindelse som har evne til å reagere med en enzymatisk aktiv polypeptidsekvens eller subsekvens eller en analog derav på en slik måte at SCCE aktiviteten blir redusert.

30

En reduksjon kan for eksempel bli målt ved å utføre et eksperiment som beskrevet i eksempel 3.2 ved anvendelse av den potensielle SCCE inhibitoren som inhibitor. Nevnte forbindelser kan være organiske molekyler, små peptider eller store polypeptider eller derivater av disse. En slik metode kan anvendes i et medikament screeningsprogram for identifisering av SCCE inhibitorer.

35

En ytterligere utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig en fremgangsmåte for identifisering av en forbindelse som har en virkning på den

enzymatiske aktiviteten til nativ SCCE omfattende anvendelse av et rekombinant polypeptid ifølge oppfinnelsen.

5 Foreliggende oppfinnelse vedrører spesielt en fremgangsmåte for identifisering av en forbindelse som har en inhibitorisk effekt på den enzymatiske aktiviteten til nativ SCCE.

I et annet aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for identifisering av en forbindelse som har evne til å forsterke den enzymatiske aktiviteten til nativ eller
10 rekombinant SCCE.

En viktig anvendelse av rekombinante polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse er i en medikament screeningsanalyse. Polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan bli anvendt i et medikament screeningsystem. Oppfinnelsen vedrører følgelig også en
15 fremgangsmåte for identifikasjon av en forbindelse som har evne til å omdanne proenzymformen av SCCE til aktiv SCCE omfattende anvendelse av et polypeptid ifølge oppfinnelsen.

Innenfor konseptet av denne oppfinnelsen kan det også tenkes anvendelse av en
20 aminosyresekvens som definert ovenfor for utledning av den tre-dimensjonale strukturen til et SCCE polypeptid for anvendelse ved konstruksjon av en forbindelse med evne til å bli bundet til SCCE polypeptidet, spesielt for anvendelse i konstruksjon av en medikamentforbindelse som blir bundet til det aktive setet av enzymet.

25 Det kan videre tenkes forskjellige metoder for regulering av aktiviteten utøvd av et SCCE polypeptid. Denne aktiviteten kan ha viktige innvirkninger på forskjellige sykdomstilstander som beskrevet ovenfor.

Et DNA eller RNA fragment som er komplementær med i det minst en del av mRNA
30 som tilsvarer polypeptid ifølge oppfinnelsen eller en analog derav kan være effektiv i og arrestere translasjonen av SCCE mRNA i humane celler og derved inhibere syntesen av polypeptidet (ene). Denne metoden som kan være av interesse i sykdomstilstander hvor en høyere enn normal ekspresjon av SCCE finnes, så som autoimmun pemfigus sykdommer eller acantolytiske sykdommer så som familiær pemfigus og Dariers sykdom, er mer kjent som antisensoligoterapi og foreliggende omfatter følgelig slike
35 metoder.

Foreliggende oppfinnelse omfatter en nukleotidsekvens, kjennetegnet ved at den koder for et polypeptid som i dets aktive form er i stand til å dekomponere substratet MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA (S-2586), dekomponeringen ved polypeptidet blir inhibert av
5 aprotinin, chymostatin og sinksulfat, og hvor polypeptidet:

- d) har en aminosyresekvens som har en identitet på minst 80% med aminosyresekvensen 1 – 224 i Seq. Id. Nr. 2;
- e) har en aminosyresekvens fra hvor en konstitutiv rekke av 20 aminosyrer er
10 identiske til en grad av minst 95% med en rekke av aminosyrer med samme lengde valgt fra aminosyresekvensen vist i Seq. Id. Nr. 2; eller
- f) er en subsekvens av polypeptidet i a) som omfatter fra 50 til 250 aminosyrer.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også en replikerbar ekspresjonsvektor som bærer og
15 som er i stand til å formidle ekspresjonen av en nukleotidsekvens som definert i et hvilket som helst av kravene 1 – 5.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse en replikerbar ekspresjonsvektor kalt pS507, kjennetegnet ved at den har blitt deponert 11. mai 1993 i Deutsche Sammlung von
20 Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) under aksjonsnummeret DSM 8282 i overensstemmelse med Budapest-overenskomsten.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse et plasmid kalt pS500, kjennetegnet ved at det har blitt deponert 11. mai 1993 i Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und
25 Zellkulturen GmbH (DSMZ) under aksjonsnummeret DSM 8281 i overensstemmelse med Budapest-overenskomsten.

Foreliggende oppfinnelse omfatter videre en vertscelle, kjennetegnet ved at den bærer en ekspresjonsvektor ifølge krav 6.

30

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å produsere et polypeptid ifølge krav 1, kjennetegnet ved at den omfatter følgende trinn:

- a) innsetting av en nukleotidsekvens som definert i et hvilket som helst av
35 kravene 1 - 5 i en ekspresjonsvektor,
- b) å transformere en egnet ikke-human vertsorganisme med vektoren produsert i trinn a),

- c) dyrke vertsorganismen produsert i trinn (b) under egnede betingelser for å uttrykke polypeptidet,
- d) høste polypeptidet, og
- e) eventuelt utsette polypeptidet for post-translasjonell modifisering.

5

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse anvendelse av et polypeptid ifølge krav 1 som et kosmetisk produkt.

10 Videre omfatter foreliggende oppfinnelse anvendelse av et polypeptid som definert i krav 1 for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling eller profylakse av kviser, xeroderma eller andre hyperkeratotiske tilstander slik som kallositeter og keratose pilaris.

15 Videre omfatter foreliggende oppfinnelse anvendelse av et polypeptid som definert i krav 1 for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling eller profylakse av forskjellige iktyoser, kviser, psoriasis eller andre inflammatoriske hudsykdommer slik som eksemer.

20 Videre omfatter foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for identifisering av en forbindelse, kjennetegnet ved at den har en effekt på enzymatisk effekt av nativt SCCE som har aminosyresekvensen 1 – 224 fra Seq. Id. Nr. 2 som omfatter anvendelse av polypeptidet som definert i krav 1.

25 Videre omfatter foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for identifisering av en forbindelse som er i stand til å konvertere proenzymformen av SCCE, kjennetegnet ved at den har aminosyresekvensen -7 – 224 fra Seq. Id. Nr. 2 til aktivt SCCE som har aminosyresekvensen 1 - 224 fra Seq. Id. Nr. 2 som omfatter anvendelsen av polypeptidet som definert i krav 1.

30 Videre omfatter foreliggende oppfinnelse et diagnostisk middel, kjennetegnet ved at det er et antistoff med spesifisitet for et polypeptid som definert i krav 1.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse et diagnostisk middel, kjennetegnet ved at det er i stand til å detektere en nukleotidsekvens ifølge krav 1 og som

35

- a) er en subsekvens av en sekvens ifølge krav 1, som har en størrelse på minst 15 nukleotider; eller

- b) som hybridiserer med sekvensen vist i Seq. Id. Nr. 1 under høstringente betingelser og har en størrelse på minst 15 nukleotider.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse en farmasøytisk sammensetning, kjennetegnet ved at den omfatter et polypeptid som definert i krav 1 som foreligger på en form som er egnet for topisk administrering valgt fra gruppen bestående av en krem, en salve, en lotion, et liniment, en gel, en pasta, en "stick", en spray, en sjampo, en såpe, en hår-"conditioner" og et pulver.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse en kosmetisk eller hudpreparatsammensetning, kjennetegnet ved at den omfatter polypeptidet som definert i krav 1 på en form som er egnet for topisk administrering valgt fra gruppen bestående av en krem, en salve, en lotion, et liniment, en gel, en pasta, en "stick", en spray, en sjampo, en såpe, en hår-"conditioner" og et pulver.

15

Fig. 1.

Unipolar celleavgivelse fra plantar stratum corneum in vitro. Vevsoverflaten med utoverside in vivo ses fra toppen i figuren. Det er å bemerke at det var en progressiv celledissosiasjon ved denne overflaten i løpet av inkubasjonen, men ingen

20 celledissosiasjon ved de andre overflatene.

Fig. 2.

Tidsforløp og virkning av aprotinin på cellefrigjøring fra plantar stratum corneum inkubert uten (sirkler) og med (trekanter) aprotinin. Gjennomsnittet (kumulative verdier for fire vevsstykker) og området er gitt.

25

Fig. 3.

Anti-desmoglein (anti-DG I) reaktive komponenter i koherent plantar stratum corneum og i dissosierte celler. A. Coomassie blå-farvet SDS-PAGE. B. Immunoblot. 1-3: Coherent vev, uforynnet (1), fortynt 1/3 (2), fortynt 1/9 (3). 4-5: dissosierte celler, uforynnede (4), fortynt 1/3 (5). Tilsynelatende intakt DG I med Mr 160 kD i koherente vev og bare degraderingsprodukter av DG I med Mr 95 og 80 kD i dissosierte celler, er å bemerke.

35 **Fig. 4.**

Tidsforløp og virkning av aprotinin på degradering av desmoglein I (DG I) i plantar stratum corneum som gjennomgår celleavgivning in vitro. Densitometriske scanninger

av immunoblot av ekstrakter av plantar stratum corneum inkubert i fravær (A) og nærvær (B) av aprotinin (15 μ M). Topp ved 160 kD tilsvarer intakt DG I. Toppene ved 95 og 80 kD tilsvarer degraderingsproduktene til dette proteinet (jfr. fig. 3). Det er å bemerke effektiv inhibisjon av aprotinin ved degradering av DG I.

5

Fig. 5

Virkning av sinkion (A), chymostatin og leupeptin (B) på degradering av desmoglein I (DG I) i plantar stratum corneum i løpet av celleavgivelse in vitro. Det er å bemerke inhibisjon av transformasjonen av anti-DG I positive komponenter fra 160 kD til 90 og 80 kD av sinkioner og chymostatin, men ikke av leupeptin.

10

Fig. 6.

Peptidhydrolyserende aktivitet assosiert med plantar stratum corneum celler. Hydrolyse av to substrater ble fulgt ved å måle forandring i absorbanse ved 405 nm.

15

Inkubasjonsmetoder i triplikat. Firkanter = S-2586; sirkler = S-2288.

Fig. 7.

pH-avhengighet av korneocyt-assosiert S-2586 hydrolyserende aktivitet.

Inkubasjonsmetoder i triplikat, firkanter = natriumacetat, sirkler = natriumfosfat,

20

trekanter = tris-HCl.

Fig. 8.

Zymografi, som viser caseinolytisk aktivitet i ekstrakter av dissosiert plantar stratum corneum celle. Se også teksten under eksempel 2.2 for eksperimentelle detaljer.

25

A: Sammenligning av enzymet fra plantar corneocyter ekstrahert med Laemmli's prøvebuffer uten reduksjonsmiddel (sc/s) og KCl (sc/k) med bovin chymotrypsin, 0.125 ng (C) og bovin trypsin, 0.5 ng (t). Før elektroforese ble KCl ekstraktet dialysert mot 5 mM tris-HCl, pH 6.8 og SDS og glycerol tilsatt for å tilveiebringe de endelige

30

konsentrasjonene som i prøvebufferen; 10 μ l tilsatt til alle kolonnene.

Molekylvektmarkørene til venstre.

B: avhengighet av pH i inkubasjonsbufferen. Enzymkilde: SDS-ekstrakter av dissosierte plantar korneocyter. Bufferer for forbehandling med Triton X-100 og inkubasjon: 0.1 M natriumacetat (pH 4.0 og pH 5.5), og 0.1 M tris-HCl (pH 7.0 og pH 8.0). Andre betingelser som i A.

35

C: virkning av inhibitorer. sc = SDS-ekstrakt av plantar korneocyter; c = bovin chymotrypsin; t = bovin trypsin. Inhibitorerne var til stede i løpet av forbehandling med triton X-100 og påfølgende inkubasjon. Sluttkonsentrasjonen av leupeptin var 160 μm , av aprotinin 15 μm , av chymostatin 40 μm og sinkioner (som sulfat) 100 μm . Leupeptin og chymostatin ble tilsatt som oppløsninger i dimetylsulfoksid (DMSO). Buffer for forbehandling og inkubasjon = 0.1 M tris-HCl pH 8 med sluttkonsentrasjon av DMSO 1% (v/v). Andre betingelser som i A.

Fig. 9

Sammenligning av SCCE, bovin chymotrypsin og human cathepsin G med hensyn på virkninger av inhibitorerne (A; aprotinin, B; chymostatin, C; sinksulfat) og substrat spesifisitet (D). I A-C var enzymaktiviteten uten inhibitor til stede standardisert til 100%. I D var enzymaktiviteten med MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA standardisert til 1 vilkårlig enhet.

Fig. 10

Affinitetskromatografi på kovalentlig koblet soyabønne trypsininhibitor (SBTI). Stiplet linje: absorbanse ved 280 nm, reflekterer proteinkonsentrasjon av eluatet. Heltrukken linje med ikke ifylte firkanter: peptidhydrolyseringsaktivitet med S-2586 som substrat, gitt som forandring i absorbanse ved 405 nm. Heltrukken linje med ikke fylte sirkler: peptidhydrolyseringsaktivitet med S-2288 som substrat, gitt som forandring i absorbanse ved 405 nm multiplisert 10-ganger.

Fig. 11

SDS-PAGE og coomassie blå-farving (A) og zymografi etter SDS-PAGE med kopolymerisert kasein (B) av fraksjonene 2, 6 og 10 fra kromatogrammet vist i figur 10. Molekylvektmarkørene til venstre. I B: 1: gruppe av kaseinolytiske komponenter som kunne bli inhibert av leupeptin (160 μm). c: gruppe av kaseinolytiske komponenter som kunne bli inhibert av chymostatin (40 μm).

Fig. 12

SDS-PAGE av SCCE rensset ved affinitetskromatografi på SBTI-Affigel 15. 12.5% gel. 1: Uredusert prøve. 2: Redusert prøve. Molekylvektmarkører til venstre.

Fig. 13

N-terminal aminosyresekvens til SCCE. Stjernene angir usikkerhet i antatte cysteiner i

posisjonene 7 og 9. Spørsmålsteget angir posisjoner hvor det ikke var mulig å detektere aminosyrederivater, men ikke fall i utbyttet i påfølgende trinn.

Fig. 14

- 5 Karakterisering av monoklonale antistoffer TE4b og TE9b ved hjelp av immunopresipitering og immunoblotting.

a: coomassie-farvet 12.5% SDS-PAGE, ikke-reduserende betingelser.

- 10 Kolonne 1: Karakterisering av monoklonale antistoffer TE4b og TE9b ved hjelp av immunopresipitering og immunoblotting.

a: coomassie-farvet 12.5% SDS-PAGE, ikke-reduserende betingelser.

- 15 Kolonne 1: molekylvektsmarkører.

Kolonne 2: KCl-ekstrakt dannet som beskrevet i eksempel 3.1 av dissosierte plantar-korneocyter.

Kolonne 3: SCCE renses som beskrevet i eksempel 4.1 ved affinitetskromatografi på usolubilisert soyabønnetrypsin inhibitor.

20

b: Zymografi av immunopresipitater i 12.5% SDS-PAGE med 0.1% ko-polymerisert varme denaturert kasein, coomassie-farvet gel.

Kolonne 1: molekylvektsmarkører.

- 25 Kolonne 2: KCl-ekstrakt, dialysert som i a.

Kolonnene 3-6: Solubiliserte immunopresipitater med (fra venstre til høyre) moab TE4b (20 µg), moab TE9b (10 µg), moab PZ (10 µg) og fosfatbufret saltvann. Moab PZ er et musemonoklonalt antistoff av IgG1-kappa type til graviditetssoneproteinet og ble anvendt som en urelatert negativ kontroll.

30

c: Immunoblot fra 12.5% SDS-PAGE (ikke-reduserende betingelser).

- 35 Kolonne 1: biotinylerede molekylvektsmarkører detektert med alkalisk fosfatase-konjugert avidin (BioRad). Elektroforet prøve i kolonnene 2, 4 og 6 samme som i kolonne 2 i a, og i kolonnene 3, 5 og 7 samme som i kolonne 3 i a.

Kolonnene 2 og 3: første antistoff = moab TE4b, 0.2 µg pr ml.

Kolonnene 4 og 5: første antistoff = moab TE9b, 0.1 µg pr ml.

Kolonnene 6 og 7: første antistoff = moab PZ, 0.1 µg pr ml.

5 Pilene i a-c angir relative molekylvekter (fra topp til bunn) 93, 66, 45, 31, 22 og 14 kD.

Fig. 15

Figur 15 viser plasmid pS500. Dette plasmidet inneholder full-lengde human SCCE
10 cDNA klonet i pUC19. For detaljert se eksempel 6.

Fig. 16

Northern blot med mRNA dannet fra human epidermis. Poly-T-renset RNA tilsvarer omtrent 100 g av total RNA ble applisert i hver kolonne. 1: Hybridisering utført med en
15 probe dannet fra et 1070 bp Hinc 2/Hinc 2 fragment av SCCE-cDNA. 2: Hybridisering utført med en probe dannet fra et 655 bp Hinc 3/Bgl 2 fragment av SCCE-cDNA.

Fig. 17

a Commassie-farvet SDS-PAGE, 12.5% gel. 1 og 2: PBS-Triton X-100 uopløselige
20 pelleter av sonikerte TG 2 celler transformert med pS510 og pS511 og indusert med IPTG. 3: SCCE renset fra human plantar stratum corneum.

b Immunoblot med kylling pre-immunserum (1-3) og kylling anti-SCCE (4-6). 1 og 4:
25 TG 2-celler transformert med pS510 og indusert med IPTG. 2 og 5: TG 2-celler transformert med pS511 og indusert med IPTG. 3 og 6: SCCE renset fra human plantar stratum corneum.

Prøvene ble dannet ved koking i prøvebuffer med merkaptoetanol.

30

Fig. 18

Figur 18 viser et rundt kart av ekspresjonsvektoren pS507, konstruert som beskrevet i eksempel 9. Vektor pS507 formidler ekspresjon av rekombinant human SCCE i
35 pattedyrceller.

Fig. 19

Figur 19 viser analyser av ekspresjon av rekombinant humant SCCE gen av pS507 i pattedyrceller.

- 5 Kolonne 1: RNA fra C127 celler.
 Kolonne 2: RNA fra en isolert klon, 1:24, av C127 celler transfektert med pS507.
 Kolonne 3: RNA fra en populasjonsblanding av C127 kloner transfektert med pS507.
 Kolonnene 4 og 5: RNA fra C127 celler transfektert med en ekspresjonsvektorm,
 pS147, som er identisk med pS507 med unntagelse av at den
 10 mangler SCCE cDNA sekvensen. Størrelsesmarkørene er indikert
 til venstre.

Fig. 20

SDS-PAGE etterfulgt av immunoblotting av SCCE uttrykt i C127 celler.

- 15 Kolonnene 1 og 6: På forhånd farvede molekylvektsmarkører (Bio-Rad, 106, 80,
 49.5, 32.5, 27.5 og 18.5 kDa)
 Kolonne 2: pS507/C127, blanding, T-flaske
 Kolonne 3: pS507/C127, blanding, "roller" A
 20 Kolonne 4: pS507/C127, blanding, "roller" B
 Kolonne 5: negativ kontroll pS522/C127
 Kolonne 7:ativ SCCE dannet fra stratum corneum
 Kolonne 8: pS507/C127, klon 24, T-flaske
 Kolonne 9: pS507/C127, klon 24, "roller" A
 25 Kolonne 10: pS507/C127, klon 24, "roller" B

Fig. 21

SDS-PAGE (A) og immunoblotting (B) av rekombinant SCCE rensset fra C127
 cellekulturmedium med celler inneholdende plasmid pS507.

- 30 Kolonnene 1 og 5: på forhånd farvet molekylvektsmarkør (Bio-Rad, 106, 80, 49.5,
 32.5, 27.5 og 18.5 kDa)
 Kolonne 2: Cellemedium før rensing
 Kolonne 3: Ubundet materiale samlet fra kromatografi
 35 Kolonne 4: Bundet materiale eluert med lav pH buffer

Fig. 22

Nativ SCCE og aktivert rekombinant SCCE analysert for aktivitet på en kasein polyakrylamidgel.

- 5 Kolonnene 1 og 10: molekylvektsmarkører (Pharmacia 14-94 kDa).
 Kolonne 2: nativ SCCE
 Kolonne 3: nativ SCCE
 Kolonnene 4-6: rekombinant SCCE spaltet i 1 time, 3 timer og over natt (460 ng/brønn).
- 10 Kolonne 7: Trypsin i samme mengde som i prøvene i kolonnene 4-6, men i fravær av APMSF.
 Kolonne 8: Trypsin i samme mengde som i prøvene i kolonnene 4-6 i nærvær av samme mengde APMSF som i prøvene.
 Kolonne 9: Samme som kolonne 3.

15

Fig. 23

Immunoblot av N-glykosidase F[®] behandlet nativ og rekombinant SCCE. Prøvene ble separert på 8-18% SDS-PAGE og immunoblottet som beskrevet ovenfor.

- 20 Kolonne 1: molekylvektsmarkør. Molekylvekter, fra toppen: 106, 80, 49.5, 32.5, 27.5 og 18.5 kDa.
 Kolonnene 2 og 3: rekombinant SCCE; 0.3 og 3 µg.
 Kolonnene 4 og 5: nativ SCCE, 1.5 og 1.8 µg. Prøvene i kolonne 3 og 5 ble behandlet med B-glykosidase F[®].

25

EKSEMPLER

EKSEMPEL 1

Bevis for at celleavgivelse fra overflaten av forhornet overflatelag til huden innbefatter
5 degradering av desmosomale proteiner og at det ansvarlige enzymet ser ut til å være en
chymotrypsin-lignende serinproteinase som kan bli inhibert av sinkioner.

1.1. Avskalling i stratum corneum

10 Formålet med studiet var å bestemme naturen til mekanismene som er ansvarlig for
cellekohejon og overflate celledissosiasjon (avskalling) i det forhornede hudlaget,
stratum corneum. Et flak stratum corneum, 0.3-0.6 mm tykt, ble kuttet parallelt med
hudoverflaten fra under en hel til en frivillig med normal hud. Vevsstykket ble dynket i
fosfatbufret saltvann med 0,1% natriumazid i 3 timer ved romtemperatur og de
15 løstkoblede cellene fra overflaten som vendte utover in vivo ble skrapet av. En mm biter
kuttet vinkelrett på vevsoverflaten ble deretter plassert i et medium inneholdende 0.1 M
tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA 0.1% natriumazid og 0.45% agarose, like før geldannelse i
mediet på grunn av tilstedeværelse av agarose. Etter inkubasjonstidene 0,5 og 15 timer
ved 37°C ble gelstykkene med vev frosset på tørris. 20 µm cryostat deler ble kuttet
20 vinkelrett for hudoverflaten i et cryostat, plassert og undersøkt i fasekontrastmikroskop.
En kontinuerlig unipolar avskalling av celler fra stykker av plantar stratum corneum
inkubert in vitro ble observert (fig. 1). Cellene ble avgitt bare fra vevsoverflaten som
hadde vendt utover in vivo. Den observerte prosessen ligner følgelig avskalling.

25 1.2. Virkninger av temperatur, pH og enzyminhibitorer

En fremgangsmåte for å kvantifisere celle avgivelsen ble deretter utviklet og
muliggjorde studier på virkninger av forskjellige parametere så som temperatur, pH og
enzyminhibitorer. Sylindre av plantar stratum corneum med diameter 3 mm ble dannet
30 med en biopsi "punch" fra vevsflak tatt og befridd fra løstkoblede overflateceller som
beskrevet ovenfor i 1.1. Sylindrene (med et definert overflateareale som vendte utover
in vivo) ble inkubert i 0.5 ml medium inneholdende 0.1 M tris-HCl pH 8,5 EDTA, 0.1%
natriumazid og med eller uten aprotinin (4×10^{-6} mol/l) (Boehringer Mannheim,
Germany) i 1.5 ml Eppendorf rør ved 37°C i 5, 10 og 20 timer og deretter aggitert i 10
35 sek. på en Vortex mikser for å frigjøre dissosierte overflateceller. Gjenværende vev ble
fjernet og plassert i friskt medium for kontinuerlig inkubasjon. Rørene med frigjorte
celler ble sentrifugert i 2 min. ved 5000 g for å samle cellene. Cellepelletene ble vasket

en gang med 0.5 ml fosfatbufret saltvann og deretter behandlet ved 60°C i 1,5 timer med 0.6 ml 1 M natriumhydroksid. Alkaliopløselig protein ble kvantifisert ifølge Lowry et al., 1951, og tatt som et mål på mengden av frigjorte celler. Resultatene er vist i fig. 2.

- 5 På lignende måte ble virkninger av forskjellige potensielle inhibitorer (aprotinin, soyabønnetrypsin inhibitor, pepstatin (Boehringer Mannheim, Germany) og jodacetamid (Sigma, St., Louis, MO) undersøkt. Enkelt 2 mm vevssylindere ble preparert og inkubert med medium med eller uten forskjellig potensielle inhibitorer i konsentrasjoner som indikert i tabell 1 nedenfor i 16 timer ved 37°C, og frigjorte celler ble kvantifisert som
- 10 beskrevet ovenfor. Det er å bemerke at EDTA (som er en inhibitor av metalloproteinaser) ble inkubert i inkubasjonsmediet for å tilveiebringe optimale cellefrigjøringsrater.

15

TABELL 1

Virkning av proteaseinhibitorer på cellefrigjøringen fra plantar stratum corneum in vitro. Gjennomsnittlig og SD for fem inkuberte vevsstykker.

20

Inhibitor	Konsentrasjon (mol/l)	Inhibisjon (%)
Ingen	-	0 ± 8
25 Aprotinin (Trasylo [®])	1.5 ± 10 ⁻⁷	18 ± 8
Aprotinin (Trasylo [®])	4 ± 10 ⁻⁷	53 ± 13
Aprotinin (Trasylo [®])	1.5 x 10 ⁻⁶	90 ± 5
Aprotinin (Trasylo [®])	4 x 10 ⁻⁶	98 ± 2
Soyabønnetrypsininhibitor	5 x 10 ⁻⁶	81 ± 9
30 Pepstatin	1 x 10 ⁻⁴	8 ± 4
Iodacetamid	1 x 10 ⁻³	6 ± 13

- Det ble oppdaget at serinproteinaseinhibitorene aprotinin og soyabønnetrypsininhibitor
- 35 effektivt inhiberer celleavgivelsen (fig. 2 og tabell 1 ovenfor). På grunn av at disse to forbindelsene var inhibitoriske, mens inhibitorer av metalloproteinaser (EDTA), tiolproteinaser (iodacetamid) og asparaginproteinaser (pepstatin) ikke var det, ble det

konkludert at en serinprotease deltar i den observerte prosessen. Det ble også konkludert med at cellekohesjon i stratum corneum er avhengig av proteinstrukturer og at en mekanisme som ligner den som er observert in vitro også må være i drift i løpet av avskalling in vivo (Lundström og Egelrud 1988).

5

I ytterligere studier av celleavgivelse in vitro fra plantar stratum corneum ble det funnet at prosessen kunne bli separert i to separate trinn. Det første trinnet foregår uansett om EDTA er til stede i inkubasjonsmediet eller ikke. Det andre trinnet oppstår bare i nærvær av EDTA. Det første trinnet kunne bli inhibert av chymostatin og sinkioner, i tillegg til aprotinin. Det andre trinnet kunne bli inhibert av aprotinin og chymostatin. (Lundström og Egelrud 1990 a). Chymostatin er en lavmolekylvektinhibitor av proteinaser med chymotrypsin-lignende substrat spesifisitet. Det er videre blitt oppdaget (Lundström og Egelrud 1990 a) at leupeptin som er en lavmolekylvektinhibitor av proteinaser med trypsin-lignende substrat spesifisitet, ikke hadde noen virkning på in vitro celleavgivelsen.

15

Proteinstrukturer som sannsynligvis er ansvarlig for cellekohesjon i stratum corneum og følgelig mulige kandidater for å bli degradert i avskallings-lignende celleavgivelse beskrevet ovenfor, er desmosomer. Et desmosom består av to symmetriske halvdelene som er beliggende i tilgrensende celler. De to halvdelene er koblet i det ekstracellulære området av transmembranproteiner betegnet desmogleiner.

20

1.3. Skjebnen til desmoglein I (DG I) i løpet av celleavgivelse in vitro.

Skjebnen til desmoglein I (DG I) i løpet av celleavgivelse in vitro fra plantar stratum corneum ble studert. Plantar stratum corneum ble inkubert som beskrevet ovenfor i 1.1 og fortsatt kohesivt vev ble separert fra dissosierte celler. Celler og vev ble ekstrahert i en buffer inneholdende 0.1 M tris-HCl pH 9, 9 M urea, 2% natrium dodecylsulfat, 1% merkaptto etanol, 1 ml buffer pr 20 mg vev, i 15 timer ved 37°C. Ekstraktene ble dannet for polyakrylamidgelelektroforese i 7.5% geler i nærvær av natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE) ifølge Laemmli (Laemmli, 1970), etterfulgt av elektroforetisk overføring (Towbin et al., 1979) til en nitrocellulosemembran (Bio-Rad, Richmond, CA) som ble probet med et kanin polyklonalt antiserum dannet mot DG I rensset fra bovine snuter (Gorbsky et al. 1985). Bundede antistoffer ble detektert med alkalisk fosfatasekonjugert geite anti-kanin immunoglobuliner (Bio-Rad, Richmond, CA) (Blake et al. 1984).

35

Resultatene er vist i figur 3. Mengder av prøve tilsatt til immunoblottet ble justert for å tilveiebringe omtrent samme proteinkonsentrasjoner (som vurdert ved visuell inspisering av Coomassie blå farvede SDS-PAGE geler) for koherente vev og dissocierte celler. Flere fortyndinger av ekstraktene ble utført for å muliggjøre en semi-
5 kvantitativ sammenligning av mengdene til de forskjellige anti-DG I reaktive komponentene i koherent stratum corneum og dissocierte celler.

Når fortsatt kohesive ble vev og dissocierte celler ekstrahert separat og det ble oppdaget at mens de fortsatt var kohesive inneholdt vevet bare omtrent intakt DG I, mens
10 dissocierte overflateceller inneholdt bare antatte degraderingsprodukter av dette proteinet (fig. 3).

I fig. 4 og 5 er virkninger av aprotinin, sinkioner, chymostatin (Boehringer, Mannheim, Germany) og leupeptin (Boehringer, Mannheim, Germany) på degradering av DG I i
15 løpet av in vitro celleavgivelse fra plantar stratum corneum vist.

Først ble tidsforløpet og virkningen av aprotinin på degradering av desmoglein I (DG I) i plantar stratum corneum som gjennomgår celleavgivelse in vitro undersøkt. Ekstrakter av plantar stratum corneum ble inkubert som beskrevet ovenfor i 1.2 (men uten
20 separering av koherent vev fra dissocierte celler før ekstrahering) i fravær eller nærvær av aprotinin (15 µM) og ekstrahert etter 0, 6, 12 eller 24 timer. SDS-PAGE og immunoblotting ble utført som beskrevet ovenfor. Densitometriske scanninger av immunoblottene ble utført i en Shimadzu CS-9000 med reflektert lys ved 560 nm i "zigzag" metoden. Resultatene er vist i figur 4. Den effektive inhibisjonen av aprotinin
25 på degradering av DG I er å bemerke.

Deretter ble virkningen av sinkion, chymostatin og leupeptin på degradering av desmoglein I (DG I) i plantar stratum corneum i løpet av celleavgivelse in vitro undersøkt. Det eksperimentelle oppsettet var som angitt ovenfor. Inkubasjonene ble
30 utført i 24 timer med sinksulfat ved konsentrasjonene 0, 1 eller 5 mM og med chymostatin eller leupeptin ved konsentrasjon 330 µM. Resultatene viste inhibisjon av transformasjonen til anti-DG I positive komponenter fra 160 kD til 95 og 80 kD av sinkioner og chymostatin, men ikke av leupeptin.

35 Det er tydelig ut fra disse resultatene at aprotinin, sinkioner og chymostatin var inhibitoriske, mens leupeptin ikke var dette. Den inhibitoriske profilen for degradering

av DG I var følgelig den samme som for celleavgivelse fra plantar stratum corneum in vitro (Lundström og Egelrud 1990 b).

Det ble betraktet som viktig å demonstrere at mekanismer som ligner de som er ansvarlig for celleavgivelse fra palmo-plantar stratum corneum er også til stede i stratum corneum til hud fra andre kroppsdelene enn håndbaker og hæler. Takahashi et al. (Takahashi et al. 1987) hadde rapportert at en blanding av detergenter N,N-dimetyldodecylaminoksid (Sigma, St. Louis, MO) og natriumdodecylsulfat (Bio-Rad, Richmond, CA) i et molar forhold på 8:2 forårsaket celledissosiasjon i ikke-palmo-plantar stratum corneum dannet ved trypsinering av helt epidermis. For å unngå kontaminering av eksogen trypsin ble "punch" biopsier av normal human hud fra gluteal regionen inkubert ved pH 8 med ovennevnte detergentblanding og EDTA (Egelrud og Lundström 1990). Det ble oppdaget at under disse betingelsene ble det forhornede laget dissosiert til enkeltceller. Tilsetning av aprotinin til inkubasjonsmediet forhindret denne celledissosiasjonen. Det ble konkludert med at også i ikke-palmo-plantar stratum corneum er cellekohesjon avhengig av proteinstrukturer, at avskalling i dette vevet er avhengig av proteolyse og at vevet inneholder en proteinase som kan katalysere denne proteolysen. På grunn av at celledissosiasjonen bare involverte stratum corneum og ikke dypere, ikke-forhornede epidermale lag, ble det konkludert med at den ansvarlige proteinasen ligger i de dypere lagene i en inaktiv eller inhibert tilstand.

EKSEMPEL 2

Oppdagelsen av stratum corneum chymotryptisk enzym (SCCE): en proteinase som oppfyller kriteriene for å være ansvarlig for degradering av intracellulære kohesive strukturer i stratum corneum in vitro og muligens også in vivo.

Ut fra eksperimentene presentert i eksempel 1 ble det konkludert med at proteinasen ansvarlig for unipolar overflatecelledissosiasjon i in vitro modellen til avskalling i plantar stratum corneum bør ha følgende egenskaper:

1. den må være tilstede i stratum corneum.
2. den må være en serinproteinase.
3. den bør ha en chymotrypsin-lignende substratspesifisitet og en inhibitor profil som ligner den som er observert for in vitro celleavgivelsen og for assosiert degradering av desmoglein I.
4. Den bør ha en ekstracellulær beliggenhet i stratum corneum.

5. Den bør ha en pH-avhengighet som muliggjør at den er aktiv under fysiologiske betingelser, i det pH til stratum corneum er rundt 4,5-6.
6. På grunn av at celleavgivelsen fra plantar stratum corneum in vitro foregår kontinuerlig i løpet av forlengede inkubasjonstider selv om volumet til inkubasjonsmediet er meget stort i forhold til volumet til de inkuberte vevsstykkene, eller om inkubasjonsmediet blir gjentatte ganger forandret i løpet av inkubasjonen, så er det sannsynlig å anta at det ansvarlige enzymet er bundet til vevet på en måte som ikke muliggjør at det blir ekstrahert inn i inkubasjonsmediet i løpet av inkubasjonen.

Følgende to eksperimenter førte til oppdagelsen av SCCE (Egelrud og Lundström 1991):

2.1. Enzymaktivitet assosiert med dissosierte plantar korneocyter

Dissosierte plantar stratum corneumceller (korneocyter) ble dannet ved hjelp av inkubasjon av plantar stratum corneum som beskrevet i eksempel 1. Cellene ble filtrert gjennom et nylonnett med mesh størrelse 100 μm og deretter vasket tre ganger i 10 volum av 0.1 M tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA og tre ganger i 0.1 M tris-HCl pH 8.

Cellene ble deretter inkubert med to typer kromogene proteinasesubstrater S-2288 eller S-2586 (Kabi Diagnostica, Stockholm, Sverige):

Ile-Pro-Arg-p-nitroanilid (S-2288) er splittet av et stort område serinproteinaser med arginin spesifisitet (for eksempel trypsin). Arg-Pro-Tyr-p-nitroanilid (S-2586) er et substrat for chymotrypsin-lignende proteinaser.

I et totalt volum på 120 μl inneholdt hver reaksjonsblanding 0.07 M tris-HCl pH 8, 0.1% natriumazid, 1, 2.5, 5 eller 10 μl av en 25% suspensjon av vaskede plantar korneocyter og 1.04 mM (S-2586) eller 1.25 mM (S-2288) substrat. Etter inkubasjon i 5 timer ved 37°C i mikrotiterskåler ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av 125 μl 10% eddiksyre. Cellene ble sedimentert og 200 μl av hver supernatant ble overført til nye brønner. Hydrolysering av de to substratene ble etterfulgt av metoder for måling av forandring i absorbanse ved 405 nm etter at cellene var blitt fjernet i en Behring Elisa Processor (Behringwerke, Marburg, Tyskland).

Som i vist i fig. 6 var det en enzymaktivitet assosiert med dissosierte plantar korneocyter som katalyserte hydrolyseringen av S-2586. Aktiviteten overfor S-2288 var derimot lav.

pH-avhengigheten til S-2586 hydrolyserende aktivitet ble deretter undersøkt. Det eksperimentelle oppsettet var som beskrevet ovenfor ved anvendelse av 10 µl av en 25% suspensjon av vaskede plantar korneocyter og buffere med forskjellig pH (natriumacetat, natriumfosfat eller tris-HCl). Endelige bufferkonsentrasjoner var 0.07

- 5 M. Resultatene er vist i fig. 7 hvor det fremgår at aktiviteten var optimal ved pH 7-8, men signifikant også ved pH 5,5.

- I et ytterligere eksperiment ble virkninger av EDTA, metallioner og proteinaseinhibitorer på hydrolyseringen av S-2586 ved pH 8 av proteinase assosiert med suspenderte plantar stratum corneum celler undersøkt. Det eksperimentelle oppsettet var som beskrevet ovenfor og i tabell 2.
- 10

TABELL 2

Virkninger av EDTA, metallioner og proteinaseinhibitorer på hydrolysering av S-2586 av proteinasen assosiert med plantar stratum corneum celler (enzymkilde: suspenderte celler)

Inhibitor	Konsentrasjon	Aktivitet (%) (\pm SD, n=3)
Ingen	-	100
EDTA ^a	4.2 mM	109 \pm 1
PMSF ^b	1 mM	8 \pm 3
Aprotinin ^a	3 μ m	10 \pm 1
Soyabønnetrypsininhibitor ^a	0.16 μ m	6 \pm 1
Chymostatin ^{a,c}	11 μ m	66 \pm 9
	55 μ m	32 \pm 0
	275 μ m	15 \pm 3
Leupeptin ^{a,c}	325 μ m	93 \pm 3
ZnSO ₄ ^a	100 μ m	10 \pm 3
HgCl ₂ ^a	100 μ m	84 \pm 2
CuSO ₄ ^a	100 μ m	85 \pm 2

^a Forbindelse til stede i analyseblandingen.

^b En 25% suspensjon av plantar stratum corneum celler dannet som beskrevet i teksten ble preinkubert i 1 time ved romtemperatur i nærvær av 1 mM PMSF (Sigma, St. Louis, MO) oppløst i 2-propanol (sluttkonsentrasjon av 2-propanol 4% v/v). Kontrollene ble preinkubert med bare 4% 2-propanol.

^c Inhibitor oppløst i dimetylsulfoksid (DMSO). Alle mediene, inkludert kontrollene, inneholdt 5% (v/v) DMSO.

Som vist i tabell 2 ovenfor inhiberte fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF; en generell inhibitor av serinproteinase), aprotinin, soyabønnetrypsininhibitor, chymostatin (en chymotrypsininhibitor) og sinkioner, men ikke leupeptin (en trypsininhibitor) den S-2586 hydrolyserende aktiviteten. Inhibitorprofilen var følgelig lik den som ble observert for in vitro celleavgivelsen og den assosierte degraderingen av desmoglein I.

2.2. Zymografi av dissosiert plantar stratum corneum

Det ble oppdaget at enzymet ansvarlig for S-2586 hydrolyserende aktivitet oppdaget i

5 2.1 kunne bli oppløst når korneocyter ble ekstrahert med 1 M KCl i 0.1 M tris-HCl pH 8. Eksperimentene med zymografi ble følgelig utført. På grunn av dette ble KCl ekstraktene av korneocyter dannet for elektroforese ifølge Laemmli (Laemmli 1970), men uten reduksjonsmiddel i prøvebuffer og uten oppvarming av prøvene. Prøvene ble også dannet ved hjelp av ekstrahering av dissosierte plantar korneocyter med Laemmlis

10 prøvebuffer uten reduksjonsmiddel ved romtemperatur. For zymografi ble en modifikasjon av prosedyren til Horie et al. (Horie et al. 1984) utført. Polyakrylamidgelelektroforese i nærvær av natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE) ble utført ifølge Laemmli i 12.5% geler med 1% kopolymerisert varme-denaturert kasein. Etter elektroforese ble gelene neddynket i en buffer inneholdende 2% triton X-100 i 1

15 time ved romtemperatur for å fjerne SDS og deretter inkubert ved 37°C i 15 timer. Gelene ble deretter farvet med Commassie blå. Separerte kaseinolytiske enzymer viste seg som klare bånd mot en blå bakgrunn. Se også teksten til fig. 8 for eksperimentelle detaljer.

20 Resultatene er vist i fig. 8. Ekstrakter av plantar korneocyter inneholdt et hovedkaseinolytisk enzym med tilsynelatende molekylvekt på omtrent 25 kD. Det var også mindre kaseinolytiske enzymer med molekylvekter rundt 30 kD. (Disse mindre komponentene ses ikke klart i figuren. Det ble senere oppdaget at de kunne bli inhibert av leupeptin, men ikke av chymostatin). 25 kD enzymet hadde betydelig aktivitet ved

25 pH 5.5-8. Den ble inhibert av aprotinin, sinkioner og chymostatin, men ikke av leupeptin. Den hadde følgelig samme inhibitorprofil som S.2586 hydrolyserende aktivitet beskrevet ovenfor. I eksperimenter med geleksklusjonskromatografi (ikke vist) ble 25 kD kaseinolytisk enzym funnet å ko-kromatograferes med S-2586 hydrolyserende aktivitet.

30 I ytterligere eksperimenter (ikke vist) med samme teknikk som beskrevet ovenfor for 2.2 ble det oppdaget at ikke-palmo-plantar stratum corneum inneholder et enzym med egenskaper som er tilsynelatende identiske med egenskapene til 25 kD proteinase assosiert med plantare korneocyter, fra nå av betegnet stratum corneum chymotryptisk

35 enzym (SCCE). (Lundström og Egelrud, 1991).

Det har også vært mulig å oppnå bevis for at SCCE er assosiert med plantar korneocyter på en måte som muliggjør at det er aktivt i stratum corneum ekstracellulært område. Dette ble utført ved først å demonstrere at dissosierte korneocyter er impermeable for pepperrot peroksidase (mr 44 kD). Det ble deretter vist at humant fibrinogen (Mr 340 kD) kunne bli degradert av en suspensjon av korneocyter, og at denne degraderingen kunne bli inhibert av samme inhibitorer som SCCE. Det kunne utelukkes at degradering av fibrinogen skyldes oppløst enzym (Egelrud 1992).

10 EKSEMPEL 3

Delvis rensing av stratum corneum chymotryptisk enzym (SCCE) og proteinase analyser med kromogene substrater.

15 3.1. Preparering av KCl ekstrakter av plantar korneocyter

Produksjon av dissosierte plantar korneocyter som beskrevet i eksempel 1 ble oppskalert og KCl-ekstrakter av vaskede plantar korneocyter inneholdende SCCE som beskrevet i eksempel 2 ble dannet.

20

Preparering av KCl ekstrakter av plantar korneocyter er skjematisk beskrevet i tabell 3 nedenfor. Hyperplastisk human plantar stratum corneum ble samlet gjennom et samarbeid med "Society for Swedish Pedicyrists". Bare materialet oppnådd ved hjelp av klippinger eller kuttinger ble anvendt. Materialet ble ikke samlet fra føtter med avskallingsforstyrrelser. Før oversendelsen ble stratum corneum lufttørket og pakket i plastposer. I laboratoriet ble det lagret ved -20°C frem til anvendelsen.

25

TABELL 3

Skjematisk beskrivelse av preparering av SCCE-inneholdende KCl-ekstrakter av
5 dissosierte plantar korneocyter.

Plantar stratum corneum		
50 g		
10	Supernatant - 15 Vaskinger ---	Inkubert ved 37°C i 24 timer i 1000 ml 0.1 M tris-HCl pH 8, 5mM EDTA, 0.1% Na-azid Sentrifuger 740 g g; 5 min. Vask pelleten med 5 x 600 ml av 0.1 M tris-HCl pH 8. Sentrifuge som ovenfor
20		Ekstraher pellet med 1 vol. 2 M KCl ⁻ i 0.1 M tris-HCl pH 8 30 min. ved 4°C sentrifugert som ovenfor
25		-ekstrakt 1 (omtrent 250 ml)
	Pellet	vask pelleten med 1 volum av 1 M KCl i 0.1 M tris-HCl pH 8 sentrifugert som ovenfor
		-ekstrakt 2 (omtrent 150 ml)

30 For hvert påfølgende affinitetskromatografitrinn ble ekstraktene 1 og 2 fra to preparater
fra 50 g hver av plantar stratum corneum slått sammen.

3.2. Proteinaseanalyser med kromogene substrater

35 En sammenligning av SCCE, bovin chymotrypsin og human kathepsin G med hensyn på
virkninger av inhibitorene aprotinin, chymostatin, sinksulfat og substrat spesifisitet ble
utført.

40 Stamopløsning av MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA (S-2586) ble dannet i destillert vann,
av Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Boehringer Mannheim, Germany) i 1-metyl-2-pyrrolidon
(sluttkonsentrasjon av oppløsningsmiddel i inkubasjonsblandingene 4%) og chymostatin

i dimetylsulfoksid (sluttkonsentrasjon av oppløsningsmiddel i inkubasjonsblandingen 1%). Kathepsin G fra purulent human sputum ble oppnådd fra E. Lotti, Geneva, Sveits. SCCE kilden var KCl-ekstrakt av dissosierte plantarkorneocytter dannet som beskrevet ovenfor. Kilde av inhibitorene aprotinin, chymostatin og sinksulfat var som beskrevet

5 ovenfor.

Inkubasjoner ble utført ved 37°C i mikrotiterskåler. Totalt inkubasjonsvolum var 135 µl i mikrotiterskåler. Totalt inkubasjonsvolum var 135 µl. Hver inkubasjonsblanding inneholdt tris-HCl pH 8.0 (sluttkonsentrasjon 0.008 M), KCl (sluttkonsentrasjon 0.2 M),

10 100 µl substratoppløsning, 25 µl enzymkilde (omtrent fortynnet i 0.1 M tris-HCl pH 8.0, 1.0 M KCl) og 10 µl inhibitoroppløsning.

I fig. 9 ble A-C, MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA (S-2586, opprinnelig konsentrasjon 1.2 mM) anvendt som substrat. I D var den opprinnelige konsentrasjonen av begge

15 substratene 1.2 mM.

Etter endt inkubasjon (1.5 time) ble 125 µl 10% eddiksyre tilsatt til hver brønn og absorbansen ble avlest ved 405 nm med inkubasjonsblandinger uten tilsatte enzymer som blankprøver. Mengdene av tilsatte enzymer ble justert for å gi en forandring i

20 absorbansen ved 405 nm ved slutten av inkubasjonene på 0.3-0.7.

Resultatene er oppsummert i fig. 9, A-D. For studier på virkninger av inhibitorene ble S-2586 anvendt som substrat. Effektiviteten til aprotinin som en inhibitor av SCCE og chymotrypsin var høy og omtrent den samme for de to enzymene. Virkningen på

25 kathepsin G var derimot mye mindre (fig. 9A). Chymostatin forårsaket inhibisjon av alle tre enzymene, men inhibitorkonsentrasjonen som forårsaker 50% inhibisjon var mer enn 3 størrelser høyere for SCCE enn for chymotrypsin og kathepsin G (fig. 9B). Sinksulfat var en effektiv inhibitor av SCCE, men ikke av chymotrypsin og kathepsin G (fig. 9 C). Aktiviteten til de tre enzymene overfor substratene MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA (S-

30 2586) og Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA er sammlignet i fig. 9D. På grunn av at hensikten var å finne likheter eller forskjeller mellom de undersøkte enzymene ble disse eksperimentene bare utført ved en opprinnelig konsentrasjon for hvert substrat. Mens Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA så ut til å være et betydelig bedre substrat enn S-2586 for chymotrypsin og kathepsin G ble det motsatte funnet for SCCE.

EKSEMPEL 4

Rensnings N-terminale aminosyresekvensbestemmelse av stratum corneum chymotryptisk enzym.

5

4.1. Rensning av SCCE fra KCl-ekstrakter av korneocyter ved hjelp av affinitetskromatografi på uopløst soyabønne trypsin inhibitor (SBTI).

Fig. 10 viser resultater av affinitetskromatografi på SBTI. Affinitetsgelen ble dannet ved kobling av 50 mg SBTI (Boehringer, Mannheim, Germany) til 12 ml sedimentert affigel 15 (BioRad, Richmond, Ca) ifølge det som blir anbefalt av forhandleren. Gjenværende aktive grupper på gelen ble blokkert med etanolamin. Kombinerte KCl-ekstrakter fra 100 g (tørrvekt) plantar stratum corneum (total volum 700 ml) ble kjørt gjennom et 0.8 x 2 cm sjikt av SBTI-Affigel 15 pakket i en glasskolonne, strømningsrate 42 ml/t, med kontinuerlig registrering av absorbansen til eluatet ved 280 nm. Kolonnen ble vasket med 0,1 M tris-HCl pH 8, 1 M KCl, helt til absorbansen av eluatet var under 0.01, og deretter med 10 ml 0.1 M tris-HCl pH 8. Trinnvis eluering av bundet materiale ble utført med HCl med 1, 10 og 100 mM. Eluatet ble skiftet når absorbansen av eluatet var redusert til under 0,01. 3 ml fraksjoner ble samlet i reagensrør som inneholdt tris-HCl pH 8, totalvolum 0,4 ml, i en mengde beregnet å være stor nok til å justere pH til eluatet til over 7. pH til hver fraksjon ble øyeblikkelig undersøkt og om nødvendig justert til omtrent 7 med små volumer 1 M tris-HCl, pH 8. Analyser av peptidhydrolyserende aktivitet med S-2586 (substrat for SCCE) og S-2288 (substrat for trypsin-lignende enzymer) ble utført som beskrevet i eksempel 2.1. Opprinnelig konsentrasjon av begge substratene i analyse-blandinger var 1.1 mM. Omtrent 90% av S-2586 hydrolyserende aktivitet var bundet til gelen. Ved trinnvis eluering av den vaskede gelen med 10-100 mM HCl kunne omtrent 60% av total S-2586 hydrolyserende aktivitet i anvendt KCl-ekstrakt bli isolert. Av total S-2288 hydrolyserende aktivitet var rundt 20% bundet til affinitetsgelen og 10% kunne bli isolert i eluatet.

30

Fig. 11 viser analyser av eluatet fra SBTI-affinitetskromatografi med polyakrylamid gelelektroforese i nærvær av SDS (SDS-PAGE) og med zymografi. Ureduserte prøver på 12.5% geler ble kjørt. Se også Engelrud og Lundström 1991 og eksempel 2, 2.2 for eksperimentelle detaljer. Før de ble preparert for elektroforese ble prøvene konsentrert omtrent 20-ganger i A ved hjelp av sentrifugefiltrering med ultrafri-MC-filtre (avspaltning 10 kD; Millipore, Bedford, MA), og fortynnet 10-ganger i B.

35

I fig. 12 er det vist en sammenligning av SDS-PAGE av en ureduisert og en redusert prøve fra SBTI-affinitetskromatografi. Som vist i figurene 10 og 11 ga SBTI-affinitetskromatografi et protein som hadde en renhet som var høyere enn 90% (vurdert ut fra Coomassie blå-farvede SDS-PAGE geler), med tilsynelatende molekylvekt rundt 25kD i ureduisert form og rundt 28 kD i redusert form. I tillegg var det en mindre Coomassie blå-positiv komponent med tilsynelatende molekylvekt på omtrent 1 kD større enn hovedkomponenten. På zymografiske geler var det et hoved og et mindre bånd med samme elektroforetiske mobiliteter som de to båndene detektert på Coomassie blå-farvede geler med ureduiserte prøver. Begge disse kaseinolytiske komponentene kunne bli inhibert av chymostatin. I tillegg viste zymografi mindre komponenter med tilsynelatende molekylvekter på rundt 30 kD som kunne bli inhibert av leupeptin. Det ble konkludert med at det vesentlige rensede proteinet var SCCE.

4.2. Analyser av N-terminal aminosyresekvens til SCCE

200 µl av en fraksjon fra et kromatogram med SBTI-Affigel 15, A_{280nm} 0.2, ble dannet for SDS-PAGE med eller uten reduksjon og kjørt på en 12.5% polyakrylamidgel (tykkelse 1 mm, vidde 73 mm). Etter elektroforese ble de separerte proteinene overført elektroforetisk til et Immobilon filter (Millipore) og farvet med Coomassie blå ifølge Matsuidaira, 1987. Hovedproteinbåndet ble kuttet ut og bearbeidet i en Applied Biosystems 477A pulset væske-fase aminosyresekvens analysator med en on-line PTH 120A analysator (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). Sekvensering ble utført med vanlige syklusprogrammer og kjemikaliene fra forhandlerene. Innledende og gjentatte utbytter, beregnet fra standardproteiner, var 25% og 97%.

Utbyttet av aminosyrederivatene var kompatibel med at bare et peptid ble sekvensert. Med ureduiserte prøver var utbyttende gode i trinnene 1-6, men falt til 0 i trinnene 7 og 9. Utbyttene i påfølgende trinn ble betydelig redusert. Også med reduserte prøver kunne ingen aminosyrederivater bli detektert i trinnene 7 og 9, men for påfølgende trinn hvor derivatene kunne bli detektert var det ingen store fall i utbyttene. Disse resultatene tyder på at det er cysteiner i posisjonene 7 og 9. Det var ikke mulig å detektere karboksymetylert cystein i trinnene 7 og 9 etter reduksjon og behandling med iodeddiksyre (100 mM). Sekvensen oppnådd (fig. 13, SEQ ID NO: 3) var identisk for reduserte og ureduiserte prøver.

EKSEMPEL 5

5.1. Preparering av SCCE-spesifikke monoklonale antistoffer

5 BALB/c mus (Bomholtgaard, Danmark) ble gitt omtrent 30 µg nativt SCCE, rensset som beskrevet i eksempel 4.1, i fra et fullstendig adjuvans (Difco Laboratories, Detroit, MI) som subkutane injeksjoner. Injeksjoner med samme mengde SCCE i Freund's ufullstendige adjuvans (Difco Laboratories, Detroit, MI) ble gjentatt etter 1 måned. Fire måneder etter den første injeksjonen ble en mus gitt intravenøse boosterinjeksjoner i 3

10 påfølgende dager, 30 µg antigen pr injeksjon. Hybridomene ble produsert ifølge metoden beskrevet i Carlsson et al., 1985, med celler fra SP2/0 myelomcellelinjen (ATCC CRL 1581). Identifikasjon av antistoffer som reagerer med rensset SCCE-preparat ble utført med en ELISA teknikk. Kultursupernatantene fra positive kloner ble ytterligere analysert ved hjelp av immunoblotting etter SDS-PAGE. Kloner som

15 produserer antistoffer reagerende med SCCE i denne testen ble propagert i museascites fluid, og antistoffene ble rensset ved protein A affinitetskromatografi og klassifisert ifølge metoden beskrevet i Carlsson et al. 1985. To nyttige antistoffer ble oppnådd, moab TE4b og moab TE9b, begge ble klassifisert som IgG₁-kappa.

20 Karakterisering av moab Te4b og TE9b ved hjelp av immunopresipitering og immunoblotting er vist i fig. 14. Fig. 14A (kolonne 2) viser en Coomassie-farvet SDS-PAGE gel med et konsentrert KCl-ekstrakt av dissosierte plantar korneocytter, dannet som beskrevet i eksempel 3.1. Prøven ble dialysert 4 timer mot 0.1 M natriumacetat, pH 4 og konsentrert omtrent 100-ganger ved ultrafiltrering før preparering før elektroforese.

25 Fig. 14a (kolonne 3) viser en preparering av SCCE, rensset som beskrevet i eksempel 4.1.

Fig. 14b viser resultater av et immunopresipiteringseksperiment hvor antistoffene var blitt inkubert med KCl-ekstrakt av korneocytter, og deretter isolert med usolubilisert

30 protein A. Resolubilisert og dissosiert antigen-antistoff komplekser ble analysert ved zymografi som beskrevet i eksempel 2.

250 µl av et KCl-ekstrakt av dissosierte plantar korneocytter som var blitt konsentrert 5-ganger ved ultrafiltrering, dialysert mot fosfatbufret saltvann, og hvor det var blitt tilsatt

35 bovint serumalbumin (Sigma, St. Louis, MO) til en sluttkonsentrasjon på 10 mg pr ml ble blandet med 10 µl antistoffopløsning eller fosfatbufret saltvann og inkubert 15 timer ved 4°C. 25 µl sedimentert protein A sepharose (Pharmacia, Uppsala, Sverige) ble

deretter tilsatt til rørene og inkubasjonene ble fortsatt med forsiktig risting ved romtemperatur i 2 timer. Gelen ble isolert ved sentrifugering og vasket 5 ganger med 1 ml 0.05% Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO) i 0.05 M tris-HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl. Etter den siste vasken ble gelen ekstrahert med 100 µl Laemmli prøvebuffer uten
5 reduksjonsmiddel i 1 time ved romtemperatur. Ekstraktene ble fjernet ved sentrifugering og applisert på gelen.

- Moab TE4b og TE9b presipiterte begge et kaseinolytisk enzym med samme Mr som renseset SCCE og det tilsvarende hovedkaseinolytiske enzymet i KCl-ekstraktet.
- 10 Antistoffene presipiterte ikke mindre kaseinolytiske enzymer i ekstraktet med Mr rundt 30 kDa, som er blitt vist å bli inhibert av leupeptin, en inhibitor av trypsin-lignende serinproteinaser. I tillegg til 25 kDa kaseinolytisk enzym så antistoffene ut til å bli bundet til en mindre proteolytisk komponent med Mr rundt 80 kDa. Denne komponenten er vanligvis tilstede i KCl ekstrakter av plantar korneocyter dannet fra vev som var blitt
15 før preparering, men som ikke finnes i preparater av friskt vev (T. Egelrud, upublisert observasjon). Det var ikke tilstede i SCCE-preparater renseset ved affinitetskromatografi og kan representere et aggregasjonsprodukt. Det var ikke mulig å detektere en tilsvarende komponent som reagerer med antistoffene på immunoblottet.
- 20 På immunoblottet av SDS-PAGE geler kjørt under ikke-reduserende betingelser (fig. 14c) reagerte moab TE4b og TE9b med en komponent tilstede i KCl-ekstraktene av plantar korneocyter (fig. 14c, kolonne 2 og 4) og i renseset SCCE-preparat (fig. 14c, kolonne 3 og 5). Begge har samme Mr som hovedrenset protein og hovedkaseinolytisk komponent på zymogrammer. Antistoffene var ikke reaktive med prøver som var blitt
25 redusert i nærvær av SDS, og dette tyder på at de er rettet mot konformasjons-avhengige epitoper.

I tillegg til hovedproteinene med Mr rundt 25 kD i ikke-redusert form inneholder det rensede SCCE-preparatet en mindre Coomassie-positiv komponent med Mr rundt 26 kD
30 (ikke-redusert; se eksempel 3). På zymogrammer er en tilsvarende kaseinolytisk komponent tilstede og kan bli inhibert av chymostatin på en måte som ligner hoved 25 kD kaseinolytisk komponent (se eksempel 3). Ved høyere konsentrasjoner av moab TE4b og TE9b (resultater ikke vist) kunne også denne mindre komponenten sees å reagere med antistoffene på immunoblottet. Lignende resultater (ikke vist) er blitt
35 oppnådd med et polyklonalt kaninantistoff dannet mot hoved coomassie-positiv komponent renseset ved preparativ elektroforese. Det nøyaktige forholdet mellom de to

proteinene med SCCE-lignende aktivitet og tilsynelatende immunologisk kryss-reaksjon er ikke kjent.

5.2. Polyklonale SCCE-spesifikke antistoffer

5

5.2.1. Kylling anti-SCCE

45 µg SCCE, rensed ved SBTI-affinitetskromatografi som beskrevet i eksempel 4.1, i 0.2 ml 0.1 M tris-HCl ble varme-denaturert i 60 minutter ved 60°C og homogenisert i et likt volum fra et fullstendig adjuvans (Difco Laboratories). Den oppnådde emulsjonen ble injisert subkutant i Derco kylling, omtrent 20 uker gamle, hvor fra en blodprøve for preparering av pre-immunt serum var blitt tappet. Kyllingene ble gitt ytterligere subkutane injeksjoner av emulsjoner dannet som beskrevet ovenfor, men med Friends ufullstendige adjuvans og med 30 µg rensed, varme-denaturert SCCE (total volum av hver emulsjon 250 µl) etter 3, 5 og 7 uker. Kyllingen ble blodtappet 2 uker etter siste injeksjon. Blodet ble øyeblikkelig blandet med 2 volum Alsevers oppløsning (pr 100 ml: 100 ml 1.87 g glukose, 0.8 g natriumsitrat, 0.63 g natriumklorid, sitronsyre til pH 6.1) og sentrifugert. Kylling anti-SCCE valgt fra ytterligere studier ble anvendt i fortynning 1/2000 i eksperimenter med immunoblotting. Se fig. 17, eksempel 8 for en illustrasjon av spesifisiteten til antiserum.

20

5.2.2. Kanin anti-SCCE

SCCE rensed ved SBTI-affinitetskromatografi ble utsatt for SDS-PAGE uten reduksjon som beskrevet i eksempel 4.1 på geler med en tykkelse på 15 mm ifølge Laemmli 1970. Hovedproteinbåndet nylig vist å være SCCE ble visualisert med kobberklorid farvemethoden ifølge Lee et al., 1987) og kuttet ut. Etter fjerning av kobberklorid med EDTA ifølge Lee et al., ble gelbitene homogenisert i fosfatbufret saltvann. Prøver av homogeniserte gelbiter ble suspendert i like volum Friends adjuvans. Omtrent 30 µg ren SCCE dannet på denne måten i fullstendig adjuvans ble gitt subkutant til en kanin. Etter 3, 5 og 7 uker ble injeksjonen gjentatt med samme mengde SCCE, men med ufullstendig adjuvans. Kaninen ble blodtappet to uker etter siste injeksjon.

30

Kanin anti-SCCE, som ble oppnådd (D-5), ble anvendt i fortynning 1/500-1/1000 i immunoblott eksperimenter med alkalisk fosfatasekonjugert anti-kanin immunoglobuliner som andre antistoff.

35

I alle immunoblotteksperimentene ble bundet andre antistoffer detektert ifølge Blake et al. 1984 (refererer til eksemplene 5, 8 og 9).

5 Kanin anti-SCCE Bo-1 ble dannet på samme måte, men med SCCE som var blitt redusert før SDS-PAGE som antigen.

5.3. Immunohistokjemiske studier med monoklonale antistoffer

10 I immunohistokjemiske studier med SCCE spesifikke monoklonale antistoffer kunne SCCE bli detektert i høye supra basale celler av human keratiniserende skjellepitel (epidermis, indre rot lag av hår follikler, hard gane), men ikke i ikke-keratiniserende skjellepitel (indre rotlag av hårfollikel, leppe og bukal mukos). SCCE kan følgelig bli spesifikt uttrykt i keratiniserende skjellepitel. SCCE ble videre funnet å bli uttrykt i høysuprabasale celler av human epidermis rekonstruert in vitro og dyrket ved lyft-vann
15 mellomfasen. Når retinoisk syre ble tilsatt til mediet ved en konsentrasjon som stimulerer keratinocytoproliferasjon, men inhiberer dannelsen av et stratum corneum ble SCCE ikke lenger uttrykt. Dette tyder på at SCCE-ekspressjonen kan være en del av epidermalt differensieringsprogram.

20 Resultater fra immunoelektromikroskopiske eksperimenter med SCCE-spesifikke monoklonale antistoffer er kompatible med en rolle til SCCE i desmosomal degradering og følgelig i avskalling. Antistoffer merket spesifikt lamellære legemer som gjennomgikk sekresjon til det intercellulære området mellom øvereste granulære celler og laveste stratum corneum celler, mens i stratum corneum gjenkjente antistoffene
25 epitoper i nær assosiasjon med desmosomene i det ekstracellulære området.

EKSEMPEL 6

30 Kloning og sekvensering av cDNA kodende for human SCCE

Restriksjonsenzymmer ble oppnådd fra Promega, Madison, MI, og TAQ-polymerase fra Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT. Et λ gt11 humant keratinocyt cDNA bibliotek dannet fra mRNA avledet fra voksne humane keratinocyter med epidermal opprinnelse ble
35 oppnådd fra Clontech Laboratories, Palo Alto, CA (katalog nr. HL 1045 b). Innledningsvis ble biblioteket screenet med anti-SCCE kanin polyklonalt sera D-5 og Bo-1 (se eksempel 5.2.2). På grunn av at Bo-1 polyklonalt anti-SCCE serum ga høye

bakgrunnssignaler ble den ekskludert fra den omfattende screeningsstudien ved et tidlig tidspunkt. Ved anvendelse av D-5 antiserum ble et antall immunoreaktive plakk anriket i det de ble betraktet for sanne positive plakk. Ingen reaktivitet med de monoklonale antistoffene moAb 4 og moAb 9 ble observert for noen av plakkene. En omfattende restriksjonsenzymkarakterisering og PCR karakterisering av 11 isolerte plakk viste at ingen likheter mellom de forskjellige plakkene kunne bli detektert. Tilstedeværelse av slike delvise likheter indikerte at plakkene inneholder homologe DNA innskudd fra samme cDNA sekvens. Basert på mangelen på å kunne definere et fingeravtrykk av en sannsynlig SCCE cDNA sekvens ble strategien modifisert.

10

Plakkene ble screenet i *E. coli* Y 1090 (Clontech) ved plakkhybridisering ved anvendelse av et degenerert syntetisk oligonukleotid som en probe.

Oligonukleotidproben ble konstruert basert på den eksperimentelt bestemte aminosyretterminale sekvensen til nativt SCCE enzym som beskrevet i eksempel 4.2. Den mest pålitelige delen av aminosyresekvensen, Ile-Ile-Asp-Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 3, aa 1 - aa 6) ble selektert for konstruksjon av en syntetisk 17-mer oligonukleotidprobe 5'-ATHATHGAYGGNGCNCC-3' (H=A eller C eller T; Y=C eller T; N=A eller C eller G eller T), betegnet SYM3067, SEQ ID NO: 4. Oligonukleotidproben ble syntetisert ved anvendelse av en Beckman 200A DNA synthesizer ved anvendelse av fosforoamiditteknikken ifølge forhandlerens instruksjoner.

20

E. coli Y 1090 bakterier ble dyrket over natt i LB medium (Sambrook et al. 1989) inneholdende 0.2% maltose og 10 mM MgSO₄. 0.4 ml av kulturen ble deretter blandet med fortyntet bibliotekfagstokk og adsorbert i 20 minutter ved 37°C. Den infiserte kulturen ble blandet med 60 ml bløtagar (0.75% agarose i LB og 10 mM MgSO₄). Bløt agaroseblandingen ble helt på 10 150 mM LA skåler. Skålene ble inkubert ved 37°C i 5 timer og deretter plassert ved 4°C over natt. Totalt inneholder platene omtrent 4×10^5 plakk.

25

For immobilisering av plakkene ble hver plate belagt med NEN DuPont Colony/Plaque Screen membranes (DuPont, Wilmington, DE) i to minutter. Membranene ble dynket to ganger to minutter i 0.5 M NaOH, 2 ganger 2 minutter i tris-HCl pH 7.5 og lufttørket. Disse membranene ble deretter anvendt i et hybridiseringseksperiment som beskrevet nedenfor. Membranene ble prehybridisert i 10% dekstransulfat, 1 M NaCl, 1% SDS oppløsning inneholdende 100 mg/ml denaturert laksespermid DNA (Sigma, St. Louis, MO) i 5 timer ved 65°C. Proben SYM 3067 ble [γ -³²P] dATP merket ved anvendelse av

35

T4 polynukleotidkinase (Promega, Madison, WI) og tilsatt til prehybridiseringsblandingen. Hybridisering ble utført i 12-18 timer ved 42°C.

Etter hybridisering ble membranene vasket fire ganger 5 minutter i 2xSSC ved
5 romtemperatur, to ganger 30 minutter i 2xSSC, 1% SDS ved 42°C og til slutt i 0.1 SSC
ved romtemperatur i 30 minutter. Membranene ble autoradiografert på røntgenfilm
(Hyperfilm-MP, Amersham, UK). Fjorten positive plakk ble identifisert i den primære
screeningen. Disse positive plakkene ble på ny screenet ved anvendelse av samme probe
og metode som beskrevet ovenfor. Etter den nye screeningsprosedyren ble to positive
10 plakk identifisert. De to valgte plakkene ble rensset en ytterligere gang og størrelsen på
innskuddene ble bestemt ved PCR ved anvendelse av SYM 1600 og SYM 1601 som
primere og isolerte fag som templat. Disse to primerene er komplementære med λ gt11
fag venstre og høyre armer. Amplifisert DNA fragment på omtrent 0,9 kb dannet fra fag
A 6.2.2 ble deretter spaltet med EcoRI og klonet inn i EcoRI spaltet pUC19 (Pharmacia,
15 Uppsala, Sverige), pS496. Dette klonfragmentet ble utsatt for en delsekvensanalyse ved
anvendelse av sekvensprimere komplementære med pUC19. Nukleotidsekvensen ble
bestemt ved anvendelse av T7 sekvenseringssett (Pharmacia, Uppsala, Sverige eller
USB, Cleveland, Ohio).

20 Translasjon av oppnådd DNA sekvens resulterte i en aminosyresekvens som var
homolog med den eksperimentelt bestemte proteinsekvensen. Sekvensen manglet
derimot et translasjonsstartkodon. For å isolere et full-lengde cDNA ble det oppnådde
DNA fragmentet separert på agarose gel og anvendt som en probe som muliggjør
hybridisering under stringente betingelser. Denne proben ble ^{32}P -merket ved
25 anvendelse av multiprimer DNA merkingssystemet (Amersham, UK) ved følgende
prosedyre. Vann ble tilsatt i et forhold på 3 ml pr gram gel og plassert i et kokende
vannbad i 7 minutter for å smelte gelen og denaturere DNA. Røret ble deretter overført
til et vannbad ved 37°C i minst 10 minutter. Et volum av DNA/agaroseoppløsningen
inneholdende 25 ng DNA ble tilsatt til merkingsreaksjon ifølge forhandlerens
30 instruksjoner.

For å oppnå full-lengde cDNA ble cDNA biblioteket på ny screenet to ganger med
denne proben ved anvendelse av de samme metodene som beskrevet ovenfor, med
unntagelse av at hybridiseringen var under stringente betingelser, ved 65°C. Disse
35 eksperimentene resulterte i identifikasjon og isolering av 45 individuelle positive plakk
som innledningsvis ble screenet ved PCR analyser ved anvendelse av
SYM 1600 (5' -GTG GCG ACG ACT CCT GGA GCC-3'; SEQ ID NO: 5) eller

SYM 1601 (5' -ACA CCA GAC CAA CTG GTA ATG-3': SEQ ID NO: 6) i kombinasjon med SYM 2308 som PCR primere for identifikasjon av en plakk inneholdende hele 5' åpen leseramme. SYM 3208, 5' - TGGGTGGGAGCCTCTTGCACA-3', SEQ ID NO: 7, som er minst delvis komplementær med 5' delen av SCCE cDNA, ble konstruert basert på DNA 5 sekvensinformasjonen oppnådd fra pS496. Etter denne screeningen ble fire plakk valgt for ytterligere analyser. Fire sekvensanalyser av de resulterende PCR amplifiserte fragmentene oppnådd fra tre fag ble klonet inn i pUC19 som beskrevet ovenfor. De oppnådde resultatene indikerte at et av fagene, 205.2.1, inneholdt et full-lengde 10 innskudd.

DNA fra fagisolat 205.2.1 ble dannet ifølge Sambrook et al. 1989, og DNA preparatet ble spaltet med EcoRI. Spaltet DNA ble separert ved agarose elektroforese og et fragment på omtrent 1 kb ble isolert og klonet inn i EcoRI spaltet pUC19. Det 15 resulterende plasmidet ble betegnet pS500 (fig. 15). Den fullstendige nukleotidsekvensen til cDNA fragmentet ble bestemt som beskrevet ovenfor. Som primere for sekvenseringsreaksjoner ble spesifikke oligonukleotider komplementære med pUC19 eller SCCE sekvenser anvendt. Nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 1) inneholdt en åpen leseramme tilstrekkelig for å kode hele aminosyresekvensen til et 20 SCCE forløperprotein bestående av 253 aminosyrer inkludert et signalpeptid og et prepolypeptid (SEQ ID NO: 2).

En annen fag betegnet 106.1.2 ble funnet å inneholde en SCCE cDNA sekvens som mangler 5'-utranslaterte sekvens og de første tre kodonene. Dette innskuddet ble isolert 25 som et 954 bp EcoRI fragment og klonet i EcoRI linearisert pUC19, resulterende i plasmid pS498. Dette plasmidet ble delvis sekvensert.

En tredje fag betegnet 108.1.2. ble funnet å inneholde en SCCE cDNA sekvens som også mangler 5'-utranslaterte sekvens og 7 nukleotider av den translaterte regionen. 30 Dette cDNA innskuddet har en lengre variant av 3'-utranslaterte region, ragende 1057 bp nedstrøms for stoppkodonet. Dette 1884 bp EcoRI fragmentet ble isolert og klonet inn i EcoRI linearisert pUC19. Det resulterende plasmidet ble fullstendig sekvensert og betegnet pS501.

EKSEMPEL 7

Deteksjon av SCCE mRNA i human epidermis

5 Preparering av totalt RNA fra human epidermis

1 Dette ble utført ifølge Chomczynski og Sacchi, 1987. Frisk human abdominal hud ble oppnådd fra plastisk kirurgi. Rett etter fjerning ble det avkjølt på is. I løpet av mindre enn 15 minutter ble epidermis isolert ved hjelp av fast skraping med en skalpell, nedsenket i oppløsning D (Chomczynski og Sacchi, 1987) og homogenisert med en glasshomogenisator. Protokollen beskrevet av Chomczynski og Sacchi ble deretter fulgt. Pelletert totalt RNA ble lagret ved -20°C i 70% etanol frem til ytterligere analyser.

Preparering av messenger RNA

15

Fem hundre mikrogram total epidermis RNA ble prosessert med poly A trakt-sett (Promega) ifølge forhandlerens instruksjoner.

RNA-elektroforese og blotting

20

Agarosegelene (1.4%) ble preparert med 0.66M formaldehyd i 1 x MOPS buffer og 0.6 g/ml etidiumbromid (Sigma, St. Louis, MO). mRNA tilsvarende 100 µg total RNA ble oppløst i RNA-prøvebuffer (50% formamid, 2.2M formaldehyd, 3% Ficoll, 1 x MOPS) og oppvarmet ved 60°C i 5 minutter før applikasjon. RNA-markørene (BRL, Gaithersburg, MD) ble likeledes behandlet. Etter elektroforese ble gelene nedsenket i destillert vann i 5 minutter etterfulgt av 50 mM NaOH i 30 minutter og 0,1 M tris-HCl pH 7.5 i 30 minutter. Blotting til GeneScreen pluss membraner (NEN DuPont, Wilmington, DE) ble utført med Vacu-Gene utstyr (Pharmacia, Uppsala, Sverige) i 1 time i 10 x SSC. Membranene ble deretter vasket i 3 x SCC, tørket over natt og bakt i 2 timer ved 80°C. RNA ble visualisert på membraner under UV lys.

cDNA-prober

Plasmid pS501, dannet som beskrevet i eksempel 6, ble spaltet med HincII og BhlII. Dette cDNA inneholder et HincII-sete ved bp No 1060 og et BglII sete ved bp No 1715. 1070 bp fragmentet (HincII-sete i pUC19 multiple kloningssete - endogent HincII-sete) inneholder SCCE kodende region med unntagelse av 7 bp ved 5' enden og en

utranslatert region, inkludert polyadenyleringssete ved bp 944-951, som er felles for alle SCCE-cDNA som er blitt isolert. 655 bp HincII - BglIII fragmentet, som ikke inneholder poly A-halen, er unikt for SCCE cDNA 108-1-2. Fragmentene ble rensset ved agaroseelektroforese og anvendt for preparering av ³²PdCTP-merkede prober med

5 Multiprime DNA merkingskit (Amersham, Buckinghamshire, UK).

Hybridisering

Membraner ble kokt i 30 min. i 1% SDS i 1x TE og prehybridisert ved 60°C i 1% SDS, 10 1 M NaCl, 10% dekstransulfat, laksesperm DNA 0.1 mg/ml i 3 timer. Hybridiseringen ble utført i samme oppløsning ved 60°C over natt. Vaskingene ble utført 2 x 30 min. ved 60°C i 1% SDS i 2 x SCC, og 3 timer i 0,1 x SSC ved romtemperatur. Membranene ble deretter utsatt for autoradiografi.

15 Resultater:

Tilstedeværelse i human epidermis av to mRNA-arter med størrelser rundt 1.2 kb og 2.0 kb kunne bli demonstrert (fig. 16). Dette er i samsvar med bevisene oppnådd ut fra kloningseksperimentene hvor to cDNA typer ble funnet.

20

EKSEMPEL 8

Ekspresjon av rekombinant SCCE i E. coli

25 Konstruksjon av pGEX-2T/SCCE-plasmider

1. Sens PCR-primere

1.a CGTGGATCCATCGAAGGTCGTATTATTGATGGCGCCCATGT (SYM 3367; 30 SEQ ID NO: 8, understreket 3'-del koder for N-terminale aminosyrer IIDGAPC av aktiv nativ SCCE, 5' delen med BamHI-setet og en ytterligere sekvens kodende for faktor Xa setet i IEGR.

1.b CGTGGATCCATCGAAGGTCGTTTGGAAACTGCAGGAGAAGAA (SYM 35 3368; SEQ ID NO: 9, understreket 3'-del tilsvarer baseparene 76-96 i fullstendig SCCE-cDNA-sekvensen kodende for aminosyresekvensen LETAGEE, 5'-delen som i 1a.

2. Anti-sens PCR-primere

TGATCCTCTGAGCTCTCCTG (SYM 3371; komplementære med baseparrene 285-304 i fullstendig SCCE-cDNA-sekvens, SEQ ID NO: 1, med SacI-setet ved bp 294).

5

En sekvens av pS498 (eksempel 6) ble PCR-amplifisert med primerene 1a/2 og 1b/2. Produktene som ble oppnådd ble rensset ved fenolekstrahering og etanolpresipitering, spaltet med BamHI/SacI og rensset ved agaroseelektroforese. De ble deretter klonet i TG2-celler inn pGEX-2T (Pharmacia) spaltet med BamHI/EcoRI sammen med 3' 673 baseparene til SCCE 106-1-2 oppnådd ved spaltning av pS498 med SacI og EcoRI. Fra bakterielle kloner anvendt for ekspresjonsstudier ble plasmider (pS510 kodende for

10 nativ N-terminal ved siden av faktor Xa sete, og pS511 kodende for antatt propeptid ved siden av faktor Xa sete) isolert, og nukleotidsekvensene som tilsvarende innskuddene avledet fra PCR produktene ble undersøkt ved dideokyskjedetermineringsmetoden ved

15 anvendelse av et T7 sekvenseringskit (Pharmacia, Uppsala, Sverige).

Ekspresjonsstudier

Overnatt-kulturer av TG 2 celler med pS510 og pS511 i LB medium inneholdende 50

20 µg/ml Carbenicillin (Sigma, St. Louis, MO) ble fortynnet 10 ganger i friskt medium og dyrket i 3 timer ved 37°C. IPTG (Sigma, St. Louis, MO) ble tilsatt til en endelig konsentrasjon på 0,1 mM og kulturene ble dyrket ved 37°C i ytterligere 3 timer. Bakterielle pelletter ble sonikert i PBS 1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO). Etter sentrifugering ved 10000 x g i 15 minutter ble supernatantene og pelletene analysert

25 ved SDS-PAGE og immunoblotting med et polyklonalt SCCE-spesifikt kylling-antiserum.

Store mengder IPTG-induserbare proteiner med Mr på omtrent 50 kD (pS510) og 52 kD (pS511) med SCCE-lignende immunoreaktivitet ble funnet i pelletter som var

30 uopløselige i PBS-Triton X-100 (se fig. 17).

Supernatanter etter sonikering i PBS-Triton X-100 inneholdt GST/SCCE fusjonsproteiner med samme størrelse som i de uopløselige pelletene, men mengdene var lave sammenlignet med uopløselige pelletter.

35

Disse resultatene viser at det er mulig å uttrykke SCCE som et fusjonsprotein med GST og sekvenser tilsvarende spesifikt proteasespaltningssete i pre-pro-SCCE

aminosyresekvensen ville gjøre det mulig å gjenta dette eksperimentet med den hensikt å produsere rekombinant SCCE i bakterier. Det produserte proteinet kan bli oppløst i urea eller guanidinium hydroklorid og deretter renset ved kationisk ionebyttekromatografi på grunn av det høye isoelektriske punktet til SCCE. Det rensede proteinet kan bli renaturert ved dialysering mot buffere med lavere konsentrasjon av denatureringsmiddel og deretter spaltet med faktor Xa for å frigjøre GST polypeptidet fra SCCE eller pro-SCCE. GST/SCCE fusjonsproteinene vil også bli anvendt som immunogener for produksjon av SCCE-spesifikke antistoffer, og som immunosorbent midler i antistoffrensing.

10

EKSEMPEL 9

Ekspresjon av rekombinant human SCCE i pattedyrceller

For å danne en ekspresjonsvektor for produksjon av rekombinant SCCE ble humane cDNA sekvenser isolert fra plasmid pS500 som et 897 bp EcoRI/DraI fragment. Dette fragmentet ble subklonet inn i EcoRI og SmaI spaltet pUC19, resulterende i pS502. Plasmidet pS502 ble deretter spaltet med EcoRI og Sall for å isolere SCCE cDNA sekvenser som et 0.9 kb fragment som igjen ble subklonet inn i en pUC19 variant som mangler HindIII setet og resulterte i plasmid pS503. Denne pUC19 varianten ble dannet ved spaltning av pUC19 med HindIII, ifylt ved anvendelse av Klenow enzym og religert. For å lette kloningen i en ekspresjonsvektor ble et HindIII sete innført i 5'-enden til SCCE cDNA. Dette ble utført ved spaltning av pS503 med EcoRI og innskudd av en linker som overfører setet til HindIII, SYM3603

5' -AATTGTGGAAGCTTCCAC-3', SEQ ID NO: 10. Det resulterende plasmidet som inneholder proteinet kodende for en del av SCCE cDNA med et HindIII sete i 5'-enden og et Sall sete i 3'-enden ble betegnet pS505.

Den endelige ekspresjonsvektoren ble oppnådd ved ligering av tre forskjellige DNA fragmenter. Først ble pS505 spaltet med HindIII og Sall, og et 0.9 kb fragment ble isolert.

Deretter for å tilveiebringe den distale delen av murin metallotionein oppstrøms regulatorisk element ble bovin papillomavirus sekvenser, kanin beta-globin genomisk fragment som tilveiebringer mRNA prosesseringssignaler og plasmidsekvenser, pML2d, for å muliggjøre seleksjon og replikasjon i *E. coli* (Waldenström et al. 1992), vektoren pS147 spaltet med SacI og Sall og et fragment på omtrent 12 kb ble isolert.

Deretter for å isolere den proksimale delen av murin metallotioneinpromoter ble plasmid pS42, hvor nativ BglIII beliggende i ledersekvensen er blitt omdannet til et HindIII sete, spaltet med SacI og HindIII og et omtrent 220 bp fragment ble isolert.

5

Ligering av disse tre fragmentene resulterte i SCCE ekspresjonsvektor pS507 (se fig. 18).

Ekspresjonsvektor pS507 ble kotransfektet med en vektor inneholdende neomycin resistensgenet drevet av Harvey sarcomavirus 5' long terminal repeat og med SV40 polyadenyleringssignaler (Lusky and Botchan, 1984) inn i murine C127 celler (ATCC CRL 1616). Transfeksjonseksperimentene ble utført ifølge kalsium-fosfat presipiteringsmetoden (Graham and Van der Eb, 1973). Cellene ble dyrket i Hams F12/Dulbeccos modifiserte Eagles medium (DMEM; Gibco BRL, Gaithersburg, MD) (1:1) supplementert med 10% føtalt kalveserum (HyClone, Logan, UT). Neomycin resistente cellekloner ble selektert med 1.5 mg/ml G418 (Gibco-BRL) og etter 10-15 dager seleksjon ble resistente cellekloner identifisert og isolert fra hovedplatene og behandlet for påfølgende analyser.

For å analysere ekspresjon av rekombinante SCCE gener ble totalt RNA dannet fra isolerte cellelinjer. Totalt RNA ble dannet fra C127 celler og separert på en 1% formaldehyd-agarosegel, overført til nitrocellulose membran og hybridisert til en ³²P-merket SCCE probe. Proben var 1070 bp HincII fragmentet til SCCE cDNA isolert ved HincII spaltning av pS500, og agaroseelektroforese. Eksperimentelle prosedyrer tilsvarte Ausubel et al., 1992. Northern blot eksperimenter og hybridisering med ³²P-merket SCCE cDNA viste at rekombinant SCCE mRNA var detekterbar i flere cellelinjer inneholdende SCCE vektor, pS507. Ingen hybridisering ble oppdaget i kontrollprøver oppnådd fra C127 cellelinjer inneholdende en identisk vektor med unntagelse av SCCE cDNA (fig. 19). Størrelsen 1.4 kb tilsvarer den ventede størrelsen.

30

Prøver av kondisjonert cellekulturmedium ble høstet og analysert ved immunoblotting. SDS-PAGE ble utført ifølge Laemmli (1970) og for immunoblotting ble kylling anti-nativt SCCE anvendt som detekterende antistoff. En alkalisk fosfatasemerket anti-kylling IgG (Sigma, St. Louis, MO) ble anvendt for enzymmerking. Resultatene er vist i fig. 20.

35

For å analysere ekspresjon av rekombinant SCCE ble totalt RNA dannet fra C127 celler transfektert med ekspresjonsvektor pS507. Som kontrollprøver ble totalt RNA dannet fra både ikke-transfektete C127 celler og fra C127 celler transfektert med ekspresjonsvektor pS147. Vektoren pS147 er lik pS507 med unntagelse av at den inneholder cDNA for human gallesalt-stimulert lipase (Nilsson et al., 1990) i stedet for humant SCCE cDNA. RNA ble dannet ifølge Ausubel et al. (1992). Northern blot eksperimenter og hybridisering med ³²P-merket SCCE cDNA viste at rekombinant SCCE mRNA på omtrent 1,4 kb var detekterbar i C127 celler inneholdende SCCE vektor, pS507 (fig. 19). Ingen hybridisering ble oppdaget i kontrollprøver oppnådd fra C127 cellelinjer inneholdende pS147 eller ikke-transfektete C127 celler. Lengden til rekombinant SCCE mRNA er som ventet.

Prøver av kondisjonert cellekulturmedium ble høstet og analysert ved SDS-PAGE og immunoblotting. Blottet ble utviklet som beskrevet i Blake et al. 1984. Oppnådde resultater (se fig. 20) viser at C127 cellene inneholdende pS507 produserer tre proteiner som viser reaksjon med alle tilgjengelige polyklonale kanin og kylling SCCE antistoffene samt med anti-SCCE monoklonaler dannet som beskrevet i eksempel 5. Rekombinante SCCE reaktive proteiner viser en tydelig molekylvekt som er omtrent 1 kDa større enn rensset nativt humant SCCE. Det rekombinante proteinet viser ingen proteolytisk aktivitet. Ved sammenligning av den utledede SCCE aminosyresekvensen med eksperimentelt bestemt NH-2 terminale enden av nativ human SCCE og med sekvenser fra andre chymotrypsin-lignende proteaser, kan det konkluderes med at rekombinant SCCE produsert i C127 celler er i pro-enzymform. Sekvensdata indikerer at dette proenzymet kan bli aktivert ved proteolytisk spaltning ved den C-terminale siden av lysin i sekvensen ...AQGDKIIDGAP..., i det det understrekede sekvensen er NH-2 sekvensen til aktiv nativ human SCCE (SEQ ID NO: 2, aa 5 - aa 6).

EKSEMPEL 10

30

Rensing og karakterisering av rekombinant SCCE

Rensing

35 1.3 mg av monoklonalt antistoff TE4b rettet mot nativ SCCE ble koblet til 1.5 ml CNBr-aktivert Sepharose (Pharmacia-LKB Biotech., Uppsala, Sverige) ved anvendelse av metoden beskrevet av forhandleren. 40 ml medium inneholdende SCCE ble filtrert

gjennom et 0.45 μm filter og deretter applisert på kolonnen. Kolonnen ble vasket flere ganger med 10 mM natriumfosfat, 150 mM NaCl, pH 7.2 og deretter eluert med 0,1 M glycyl-HCl, pH 2.5. Eluert protein ble øyeblikkelig nøytralisert ved tilsetning av 0.1 volum 1 M tris-HCl, pH 8.0.

5

Aktivering

Rekombinant SCCE (4.6 μg i 200 μl), rensert ved anvendelse av gelen med monoklonalt antistoff koblet (se ovenfor) ble spaltet med 4,6 μl 0.1 mg/ml trypsin (masseforhold 10:1) ved 37°C. Prøver (50 μl) ble tatt etter 20 minutter, 1 time, 3 timer og 20 timer, og 5 μl 10 μM (4-amidinofenyl)metansulfonyl (APMSF; Boehringer Mannheim, Germany) ble tilsatt for å avslutte reaksjonen. Aktiviteten til spaltet SCCE ble analysert ved ikke-reducerende SDS-PAGE på kaseingeler som beskrevet i eksempel 2.2. Identiteten til oppnådde spaltede former av SCCE ble analysert på reducerende SDS-PAGE etterfulgt av immunoblotting ved anvendelse av kylling anti-nativt SCCE etterfulgt av en alkalisk fosfatase merket anti-kylling IgG og nitro blå tetrazolium og 5-brom-4-klor-3-indolyl fosfat som substrat for alkalisk fosfatase.

20

N-terminal sekvensering

Affinitetsrenset (som beskrevet ovenfor) SCCE, omtrent 35 μg , ble slot-blottet ved anvendelse av en Bio-Dot SF enhet (Bio-Rad, Richmond, CA) på en Immobilon-membran (Millipore, Bedford, MA). Membranen ble deretter vasket flere ganger med destillert vann for å fjerne all tris og glycyl. Den delen av membranen hvor proteinet var bundet ble spaltet ut og sekvensert ved anvendelse av Applied Biosystems (Foster City, CA) 477A puls væskefase sekvenser med en on-line PTH 120A analyser. Sekvensering ble utført med vanlige syklusprogrammer og kjemikalier fra forhandleren. Sekvensen oppnådd i de første 6 posisjonene var glu-glu-ala-gln-gly-asp som tilsvarer aminosyrene -7 - -2 ifølge SEQ ID NO: 2. Det kan bli konkludert ut fra dette resultatet at signalpeptidet består av 22 aminosyrer og basert på den N-terminale aminosyresekvensen av nativ aktiv SCCE består propeptidet av 7 aminosyrer.

30

Deglykosylering

Rensert rekombinant SCCE (5 μg) og nativ SCCE (20 μg) ble kokt i 3 minutter i 20 μl 0,5% SDS og 0.1 M β -merkaptoetanol. Prøvene ble fortynnet med natriumfosfatbuffer, pH 8.6, og nonidet P-40 til sluttkonsentrasjoner på 0.2 M og 1.25%. N-glykosidase F[®]

35

(Boehringer Mannheim) ble tilsatt (for rekombinant protein 0.6 enheter og for nativt protein 1.2 enheter enzym) og reaksjonsblandingen ble inkubert over natt ved 37°C. Sluttkonsentrasjonen av SDS i prøveanalysen var 0.17%. N-glykosidase F[®] behandlet SCCE ble analysert på 8-18% SDS-PAGE etterfulgt av immunoblotting som beskrevet

5 ovenfor. De oppnådde resultatene viser reduksjon i tilsynelatende molekylvekt i to øvre bånd, men den tilsynelatende molekylvekten til det laveste båndet var uforandret (figur 23). Dette viser at rekombinant SCCE produsert i C127 celler eksisterer i to N-glykosylerte former og en ikke-glykosylert form. Dette resultatet er analogt med det som sees med aktivt nativt SCCE (figur 23).

10

EKSEMPEL 11

Sammensetninger som omfatter SCCE

15 Sammensetninger kan bli dannet ifølge konvensjonelle farmasøytiske teknikker inkludert blanding av de aktive forbindelsene grundig med de andre ingrediensene. Alle prosentandeler er i vekt.

20 Sammensetninger som omfatter mer enn en aktiv forbindelse hører også inn under rammen av oppfinnelsen. De følgende eksemplene kan følgelig bli konstruert å inneholde mer enn en aktiv forbindelse. På lignende måte kan betegnelsen "SCCE" bli erstattet med "pro-SCCE". Sammensetninger som omfatter SCCE samt pro-SCCE hører følgelig også inn under rammen av oppfinnelsen.

25 SCCE = nativt eller rekombinant stratum corneum chymotryptisk enzym, eventuelt i kombinasjon med andre aktive forbindelser

q.s. = quantum satis

	Krem o/w	%
	SCCE	0.01-20
	Polysorbat 80	0.5
	Emulgerende voks	5
5	Mineralolje	4
	Dimeticon	1
	Glycerolstearat	6
	Antioksidant	q.s.
	EDTA	0.1
10	Konserveringsmiddel	q.s.
	Glycerin 85%	4
	Propylenglykol	7
	pH regulerende middel	0.01-10
	vann	65-76

15

Eksempler på variable faktorer: antioksideringsmidler, gelateringsmidler, konserveringsmidler, emulgeringssystemer (proporsjonen mellom oljeholdig fase og vandig fase og innholdet av emulgerende midler og andre relevant eksipienter).

	Krem w/o	%
20	SCCE	0.01.20
	Cetylalkohol	0.5
	Lanolin	5
	Hvit vaselin	10
25	Mineralolje	45
	Antioksideringsmiddel	q.s.
	EDTA	1
	pH regulerende middel	0.01-10
	Konserveringsmiddel	q.s.
30	Vann	15-25

Eksempler på variable faktorer: antioksyderingsmidler, chelatdannere, konserveringsmidler, emulgeringssystemer (forholdet mellom den oljeholdige fasen og den vandige fasen og innholdet av emulgeringsmidlene og de andre relevante eksipientene).

35

	Salve	%
	SCCE	0,01-20
	Lanolin	15
	Petrolatum	58-68
5	Mineralolje	15
	Dimeticon	2
	Antioksideringsmiddel	q.s.

Eksempler på variable faktorer: antioksideringsmidler.

	Flytende salve	%
	SCCE	0.01-20
	Emulgerende voks	4
	Glyceryl stearat	3
15	Mineralolje	15
	Polysorbat 80	0.6
	Glycerin 85%	3
	Propylenglykol	5
	Antioksideringsmiddel	q.s.
20	EDTA	0.1
	Konserveringsmiddel	q.s.
	Vann	59-69

Eksempler på variable faktorer: antioksideringsmidler, chelatdannere,
 25 konserveringsmidler, emulgerende systemer (forholdet mellom oljeholdig fase og vandig fase og innhold av emulgerende midler og andre relevante eksipienter).

	Gel	%
	SCCE	0,01-20
30	Trietanolamin	1-5
	Etylalkohol	10
	Cetylalkohol	10
	Cellulose gummi	5
	EDTA	0.1
35	Konserveringsmiddel	q.s.
	Vann	59-74

Eksempler på variable faktorer: geldannende midler, antioksyderingsmidler, chelatdannere, konserveringsmidler.

	Oppløsning, vann	%
5	SCCE	0.01-20
	pH regulerende middel	0.01-10
	Cetylalkohol	4
	Propylen glykol	5
	Konserveringsmiddel	q.s.
10	Antioksyderingsmiddel	q.s.
	EDTA	0.1
	Vann	37-89

Eksempler på variable faktorer: antioksidanter, chelaterings midler, konserveringsmidler, refettingsmidler, fuktemidler.

	Oppløsning, etylalkohol	%
	SCCE	0.01-20
	pH regulerende middel	0.01-10
20	Propylenglykol	5
	Cetylalkohol	3
	Antioksideringsmiddel	q.s.
	EDTA	0.1
	Etylalkohol	50-95

25

Eksempler på variable faktorer: antioksideringsmidler, chelatdannere, fuktemidler.

	Suspensjon	%
	SCCE	0.01-20
30	Carbomer	0.5
	Cellulosegummi	0.5
	Polysorbat 80	0.1
	Propylenglykol	5
	Askorbinsyre	0.05
35	Cetylalkohol	4
	Polysorbat	q.s.
	EDTA	0.1

pH regulerende middel	0.01-10
Vann	72-80

5 Eksempler på variable faktorer: antioksideringsmidler, chelatdannere, konserveringsmidler, suspenderingsmidler:

Pasta	%
SCCE	0.01-20
Vaselin	45-55
10 Sinkoksid	40
Mineralolje	5
Antioksideringsmidler	q.s.

15 Eksempler på variable faktorer: antioksidanter, pastabaser.

Pinne	%
SCCE	0.01-20
Cutina LM	70-80
Myristylalkohol	5
20 Lakserolje	2
Bivoks, hvit	10
Vaselin, hvit	3
Antioksideringsmiddel	q.s.

25 Eksempler på variable faktorer: antioksideringsmidler, pinne-baser.

Spray - manuell	%
SCCE	0.01-20
pH regulerende middel	0.01-10
30 Etylalkohol	30
Glycerin 85%	5
Propylenglykol	5
Cetylalkohol	3
Antioksideringsmiddel	q.s.
35 EDTA	0,1
Konserveringsmiddel	q.s.
Vann	22-57

Eksempler på variable faktorer: antioksideringsmidler, chelatdannere, konserveringsmidler, refettingsmidler, fuktemidler.

5	Spray aerosol oppløsning	%
	SCCE	0.01-20
	pH regulerende middel	0.01-10
	Isopropylmyristat	3
	Propylenglykol	5
10	Etylalkohol	48-92
	Drivmiddel	q.s.

Eksempler på variable faktorer: refettingsmidler, fuktemidler.

15	Spray - aerosol skum	%
	SCCE	0.01-20
	Voks	3
	Etylalkohol	50-55
	Antioksideringsmiddel	q.s.
20	EDTA	0.1
	Vann	20-35
	Drivmiddel	q.s.

Eksempler på variable faktorer: drivmidler, antioksideringsmidler, chelatdannere.

25	Spray aerosol emulsjon	%
	SCCE	0.01-20
	Cellulosederivater	1-3
	Tween® 60	1.0
30	Glycerylstearat	2.5
	Kaliumsorbat	0.2
	Antioksideringsmiddel	q.s.
	EDTA	0.1
	Konserveringsmiddel	q.s.
35	pH regulerende middel	0.01-10
	Vann	50-95
	Drivmiddel	q.s.

Eksempler på variable faktorer: antioksideringsmidler, chelatdannere, konserveringsmidler, emulgeringssystemer (forhold mellom oljeholdig fase og vandig fase og innhold av emulgeringsmidler og andre relevante eksipienter).

5	Shampoo	%
	SCCE	0.01-20
	Natriumlaurylsulfat	40
	Cetylalkohol	3
10	Skummiddel eller kondisjoneringsmiddel	3
	Natriumklorid	2
	Antioksideringsmiddel	q.s.
	EDTA	0.1
	Konserveringsmiddel	q.s.
15	Vann	43-53

Eksempler på variable faktorer: shampooobaser, antioksideringsmidler, chelatdannere, konserveringsmidler, fuktemidler, kondisjoneringsmidler.

20	Kroppsshampoo	%
	SCCE	0.01-20
	Natrium laurylsulfat	40
	Cetylalkohol	4
	Skumdannende middel eller kondisjoneringsmiddel	3
25	Perledannende middel	10
	Konserveringsmiddel	q.s.
	Antioksideringsmiddel	q.s.
	EDTA	0.1
	Vann	40-50

30

Eksempler på variable faktorer: shampooobaser, antioksideringsmidler, chelatdannere, konserveringsmidler, additiver, kondisjoneringsmidler.

	Medisinerende såpe	%
	SCCE	0.01-20
	1-hydroksyetan-1,1-difosforsyre	0.2
	Glycerin	0.8
5	Natriumsåpe av kokosolje og talg	88-98
	Additiver	0.7

Eksempler på variable faktorer: fuktemidler, såpe-baser.

10	Pulvere	%
	SCCE	0.01-20
	Talk	65-70
	Kaolin	6
15	Titandioksid	2
	Kalsiumkarbonat	8
	Magnesium stearat	3
	Mais eller havre stivelse	5-10

20 Eksempler på variable faktorer: pulverbaser, konserveringsmidler, masseforhold.

	Hårkondisjoneringsmiddel	%
	SCCE	0.01-20
	Cetylalkohol	2.2
25	Alkyltrimetylammoniumklorid	1.25
	Oktyldodecanol	1
	Sitronsyre	1
	EDTA	0.1
	Konserveringsmiddel	q.s.
30	Antioksideringsmiddel	q.s.
	Vann	ad 100

Eksempler på variable faktorer: kondisjoneringsmidler, konserveringsmidler, chelatdannere, antioksideringsmidler.

35

På lignende måte kan topiske sammensetninger omfattende en forbindelse som har evne til å inhibere eller forsterke aktiviteten til SCCE bli fremstilt.

EKSEMPEL 12**Desmosomfordøyningsaktiviteten til rekombinant SCCE**

- 5 Korneocyter inneholdende intakte desmosomer ble fjernet fra huden ved stripping av tape til dypere lag av stratum corneum, og skjellene ble fjernet med heksan og tørket til alikvoter. Korneocyt alikvoter (3 mg) ble ekstrahert med 1M natriumklorid ved 4°C for å solubilisere intrinsiske proteaser og deretter omfattende vasket med inkubasjonsbuffer (0.1M tris/HCl pH 8.0) for å fjerne endogen proteolytisk aktivitet fra preparatene.
- 10 Inkubasjonene ble utført i 0.1M tris pH 8.0 med eller uten 10 µg rekombinant SCCE i 2 timer ved 37°C. Tegn på desmosal fordøyning av enzymet ble demonstrert ved måling av nivåer av desmosom markørprotein desmoglein I (DG I). Dette ble isolert fra skjellene ved ekstrahering i en 8M urea/2%SDS/β-merkaptolanolbuffer med påfølgende rensing av DG I glykoproteinet ved anvendelse av concanavalin A
- 15 affinitetskromatografi. Concanavalin A eluatet ble fraksjonert ved SDS-PAGE og overført elektroforetisk til en PDVF membran for immunoblotting. DG I ble identifisert ved anvendelse av et spesifikt antiserum og detektert ved anvendelse av forsterket kjemiluminesens. Resultatene er vist i tabell 4.

20

TABELL 4

	Kontroll	+ rSCCE, 10 µg
25 DG I (vilkårlige enheter/mg skjell)	7950 ± 4992	4059 ± 2360

- 30 Resultatene presentert i tabell 4 viser at rekombinant SCCE har evne til å degradere intracellulære kohesive strukturer i stratum corneum i en in vitro analyse.

EKSEMPEL 13

Virkninger av inhibitorer på aktiviteten til rekombinant SCCE.

- 5 Virkningen av inhibitorene aprotinin, chymostatin og sinkisulfat på S-2586 hydrolyserende aktivitet til rSCCE ble undersøkt. Det eksperimentelle oppsettet er som beskrevet i eksempel 3.2. Resultatene er vist i tabell 5.

10

TABELL 5

Inhibitor	konsentrasjon (μm)	aktivitet (%)
15 Aprotinin	0	100
	0.35	51.6
	1.4	21.2
	5.7	7.4
20 Chymostatin	0	100
	0.64	74.9
	2.56	33
	41	1.9
25 ZnSO ₄	0	100
	15.6	50.7
	62.5	19.4
	250	5.1

30

Som vist i tabell 5 ovenfor inhiberer aprotinin, chymostatin og sinkisulfat S-2586 hydrolyserende aktivitet til rekombinant SCCE på lignende måte som for det native enzymet.

35 **REFERANSER**

- Ausubel et al. (1992). *Current protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons
- Blake et al. (1984). *Anal Biochem* 136:175-179

- Carlsson et al. (1985). *Molec Immun* 22:1073-1080
- Caughey et al. (1991). *J Biol Chem* 266:12956-12963
- Chomczynski and Sacchi (1987). *Anal Biochem* 162:156-159
- Egelrud and Lundström (1990). *J Invest Dermatol* 95:456-459
- Egelrud and Lundström (1991). *Arch Derm Res* 283:108-112
- Egelrud (1992). *Eur J Dermatol* 2:50-55
- Gorbsky et al. (1985). *Proc Natl Acad Sci USA* 82:810-814
- Graham and Van der Eb (1973). *Virology* 52:456-467
- Hogan, B., Constantini, F. and Lacy, E. (1986).
Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. Cold
Spring Harbor Press
- Horie et al. (1984). *Comp Biochem Physiol* 77B:349-354
- Laemmli (1970). *Nature* 227:680-685
- Lee et al. (1987). *Anal Biochem* 166:308-312
- Lowry et al. (1951). *J Biol Chem* 193:265-275
- Lundström and Egelrud (1988). *J Invest Dermatol* 91:340-343
- Lundström and Egelrud (1990 a). *Arch Derm Res* 282:234-237
- Lundström and Egelrud (1990 b). *J Invest Dermatol*
94:216-220
- Lundström and Egelrud (1991). *Acta Derm Venereol (Stockh)*
71:471-474
- Lusky and Botchan (1984). *Cell* 36:391-401
- Matsudaira P (1987). *J Biol Chem* 262:10035-10038
- Mizutani et al. (1991). *J Clin Invest* 87:1066-1071
- Nilsson et al. (1990) *Eur J Biochem* 192:543-550
- Norris (1990). *J Invest Dermatol* 95:371
- Salvesen et al. (1987). *Biochemistry* 26:2289-2293
- Sambrook et al. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory
Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor
- Schechter et al. (1983). *J Biol Chem* 258:2973-2978
- Schechter et al. (1989). *J Biol Chem* 264:21308-21315
- Schwartz et al. (1987). *J Immunol* 138:2611-2615
- Takahashi et al (1987). *J Soc Cosmet Chem* 38:21-28
- Toulta et al. (1989). *EBRC* 158:569-575
- Towbin et al. (1979). *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354
- Waldenström et al. (1992) *Gene* 120:175-181
- Wintroub et al. (1986). *J Clin Invest* 77:196-201
- WO 93/04172 (filed by Symbicom Aktiebolag on 19 August
1992)

SEKVENSLISTE

(1) GENERELL INFORMASJON:

5

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: SYMBICOM AS
- (B) STREET: PO BOX 1451
- (C) CITY: UMEA
- (E) COUNTRY: SWEDEN
- (F) POSTAL CODE (ZIP): S-901 24

(ii) TITLE OF INVENTION: Recombinant Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme (SCCE)

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 10

15

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

20

25

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

- (A) LENGDE: 986 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅDTYPE: enkel
- (D) TOPOLOGI: lineær

35

(ii) MOLEKYL: cDNA

(iii) HYPOTETISK: nei

(iii) ANTI-SENS: nei

(vi) OPPRINNELIG KILDE:

(A) ORGANISME: homo sapiens

5

(ix) TREKK:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 25..786

10

(ix) TREKK:

(A) NAME/KEY: sig_peptid

(B) BELIGGENHET: 25..90

15

(ix) TREKK:

(A) NAME/KEY: mat_peptid

(B) BELIGGENHET: 122..783

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 1:

20

```
GAATTCCGCG GATTTCCGGG CTCC ATG GCA AGA TCC CTT CTC CTG CCC CTG      51
                Met Ala Arg Ser Leu Leu Leu Pro Leu
                -29                -25
```

25

```
CAG ATC CTA CTG CTA TCC TTA GCC TTG GAA ACT GCA GGA GAA GAA GCC      99
Gln Ile Leu Leu Leu Ser Leu Ala Leu Glu Thr Ala Gly Glu Glu Ala
-20                -15                -10                -5
```

30

```
CAG GGT GAC AAG ATT ATT GAT GGC GCC CCA TGT GCA AGA GGC TCC CAC      147
Gln Gly Asp Lys Ile Ile Asp Gly Ala Pro Cys Ala Arg Gly Ser His
                1                5                10
```

```
CCA TGG CAG GTG GCC CTG CTC AGT GGC AAT CAG CTC CAC TGC GGA GGC      195
Pro Trp Gln Val Ala Leu Leu Ser Gly Asn Gln Leu His Cys Gly Gly
                15                20                25
```

```
GTC CTG GTC AAT GAG CGC TGG GTG CTC ACT GCC GCC CAC TGC AAG ATG      243
Val Leu Val Val Asn Glu Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Met
                30                35                40
```

35

	AAT GAG TAC ACC GTG CAC CTG GGC AGT GAT ACG CTG GGC GAC AGG AGA	291
	Asn Glu Tyr Thr Val His Leu Gly Ser Asp Thr Leu Gly Asp Arg Arg	
	45 50 55 60	
5	GCT CAG AGG ATC AAG GCC TCG AAG TCA TTC CGC CAC CCC GGC TAC TCC	339
	Ala Gln Arg Ile Lys Ala Ser Lys Ser Phe Arg His Pro Gly Tyr Ser	
	65 70 75	
	ACA CAG ACC CAT GTT AAT GAC CTC ATG CTC GTG AAG CTC AAT AGC CAG	387
	Thr Gln Thr His Val Asn Asp Leu Met Leu Val Lys Leu Asn Ser Gln	
10	80 85 90	
	GCC AGG CTG TCA TCC ATG GTG AAG AAA GTC AGG CTG CCC TCC CGC TGC	435
	Ala Arg Leu Ser Ser Met Val Lys Lys Val Arg Leu Pro Ser Arg Cys	
	95 100 105	
	GAA CCC CCT GGA ACC ACC TGT ACT GTC TCC GGC TGG GGC ACT ACC ACG	483
	Glu Pro Pro Gly Thr Thr Cys Thr Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Thr	
15	110 115 120	
	AGC CCA GAT GTG ACC TTT CCC TCT GAC CTC ATG TGC GTG GAT GTC AAG	531
	Ser Pro Asp Val Thr Phe Pro Ser Asp Leu Met Cys Val Asp Val Lys	
	125 130 135 140	
	CTC ATC TCC CCC CAG GAC TGC ACG AAG GTT TAC AAG GAC TTA CTG GAA	579
	Leu Ile Ser Pro Gln Asp Cys Thr Lys Val Tyr Lys Asp Leu Leu Glu	
20	145 150 155	
	AAT TCC ATG CTG TGC GCT GGC ATC CCC GAC TCC AAG AAA AAC GCC TGC	627
	Asn Ser Met Leu Cys Ala Gly Ile Pro Asp Ser Lys Lys Asn Ala Cys	
	160 165 170	
	AAT GGT GAC TCA GGG GGA CCG TTG GTG TGC AGA GGT ACC CTG CAA GGT	675
	Asn Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Arg Gly Thr Leu Gln Gly	
25	175 180 185	
30		
35		

5

CTG GTG TCC TGG GGA ACT TTC CCT TGC GGC CAA CCC AAT GAC CCA GGA 723
 Leu Val Ser Trp Gly Thr Phe Pro Cys Gly Gln Pro Asn Asp Pro Gly
 190 195 200.

10

GTC TAC ACT CAA GTG TGC AAG TTC ACC AAG TGG ATA AAT GAC ACC ATG 771
 Val Tyr Thr Gln Val Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Asn Asp Thr Met
 205 210 215 220

AAA AAG CAT CGC TAACGCCACA CTGAGTTAAT TAACTGTGTG CTTCCAACAG 823
 Lys Lys His Arg
 225

15

AAAATGCACA GGAGTGAGGA CGCCGATGAC CTATGAAGTC AAATTTGACT TTACCTTTCC 883

TCAAAGATAT ATTTAAACCT CATGCCCTGT TGAATAACCA ATCAAATTGG TAAAGACCTA 943

AAACCAAAC AAATAAAGAA ACACAAAACC CTCACGGAA TTC 986

20

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 2:

25

(i) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 253 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

30

(ii) MOLEKYLTTYPE: protein

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 2:

35

Met Ala Arg Ser Leu Leu Leu Pro Leu Gln Ile Leu Leu Leu Ser Leu
 -29 -25 -20 -15
 Ala Leu Glu Thr Ala Gly Glu Glu Ala Gln Gly Asp Lys Ile Ile Asp
 -10 -5 1
 5 Gly Ala Pro Cys Ala Arg Gly Ser His Pro Trp Gln Val Ala Leu Leu
 5 10 15
 Ser Gly Asn Gln Leu His Cys Gly Gly Val Leu Val Asn Glu Arg Trp
 20 25 30 35
 Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Met Asn Glu Tyr Thr Val His Leu
 10 40 45 50
 Gly Ser Asp Thr Leu Gly Asp Arg Arg Ala Gln Arg Ile Lys Ala Ser
 55 60 65
 Lys Ser Phe Arg His Pro Gly Tyr Ser Thr Gln Thr His Val Asn Asp
 70 75 80
 15 Leu Met Leu Val Lys Leu Asn Ser Gln Ala Arg Leu Ser Ser Met Val
 85 90 95
 Lys Lys Val Arg Leu Pro Ser Arg Cys Glu Pro Pro Gly Thr Thr Cys
 100 105 110 115
 20 Thr Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Thr Ser Pro Asp Val Thr Phe Pro
 120 125 130
 Ser Asp Leu Met Cys Val Asp Val Lys Leu Ile Ser Pro Gln Asp Cys
 135 140 145
 Thr Lys Val Tyr Lys Asp Leu Leu Glu Asn Ser Met Leu Cys Ala Gly
 150 155 160
 25 Ile Pro Asp Ser Lys Lys Asn Ala Cys Asn Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 165 170 175
 Leu Val Cys Arg Gly Thr Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly Thr Phe
 180 185 190 195
 30 Pro Cys Gly Gln Pro Asn Asp Pro Gly Val Tyr Thr Gln Val Cys Lys
 200 205 210
 Phe Thr Lys Trp Ile Asn Asp Thr Met Lys Lys His Arg
 215 220

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 24 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyrer

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

10 (iii) HYPOTETISK: nei

(v) FRAGMENTTYPE: N-terminal

(vi) OPPRINNELIG KILDE:

15 (A) ORGANISME: homo sapiens

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 3:

20 **Ile Ile Asp Gly Ala Pro Cys Ala Cys Gly Ser Xaa Pro Xaa Gln Val**
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Ser Gly Asn Gln Leu
 20

25

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 17 basepar

30 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA

35

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 4:

ATHATHGAYG GNGCNCC

17

5 (2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 5:

(i) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 21 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

10 (C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: DNA

15

(xi) SEKVENNSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 5:

GTGGCGACGA CTCCTGGAGC C

21

20

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 6:

(i) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

25 (A) LENGDE: 21 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: lineær

30 (ii) MOLEKYLTYPE: DNA

(xi) SEKVENNSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 6:

35 ACACCAGACC AACTGGTAAT G

21

86

(C) TRÅDTYPE: enkel
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA

5

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEQ ID NO: 9:

CGTGGATCCA TCGAAGGTCG TTTGGAAACT GCAGGAGAAG AA 42

10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 10:

(i) SEKVENS KARAKTERTREKK:

15

(A) LENGDE: 18 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅDTYPE: enkel
(D) TOPOLOGI: lineær

20

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA

(xi) SEKVENSBEKRIVELSE: SEQ ID NO: 10:

25 AATTGTGGAA GCTTCCAC

18

P a t e n t k r a v

1.

Nukleotidsekvens, k a r a k t e r i s e r t v e d at den koder for
5 et polypeptid som i dets aktive form er i stand til å dekomponere substratet MeO-Suc-
Arg-Pro-Tyr-pNA (S-2586), dekomponeringen ved polypeptidet blir inhibert av
aprotinin, chymostatin og sinksulfat, og hvor polypeptidet:

- 10 g) har en aminosyresekvens som har en identitet på minst 80% med aminosyre-
sekvensen 1 – 224 i Seq. Id. Nr. 2;
- h) har en aminosyresekvens fra hvor en konstitutiv rekke av 20 aminosyrer er
identiske til en grad av minst 95% med en rekke av aminosyrer med samme
lengde valgt fra aminosyresekvensen vist i Seq. Id. Nr. 2; eller
- i) er en subsekvens av polypeptidet i a) som omfatter fra 50 til 250 aminosyrer.

15

2.

Nukleotidsekvensen ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
den har en identitet med sekvensen vist i Seq. Id. Nr. 1 på minst 90%.

20

3.

Nukleotidsekvensen ifølge krav 1, som er en subsekvens av sekvensen i a) eller b) som
har en størrelse på minst 15 nukleotider.

4.

25

Nukleotidsekvensen ifølge ethvert av kravene 1 – 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den hybridiserer med sekvensen vist
i Seq. Id. Nr. 1 under høystringente betingelser og har en størrelse på minst 15
nukleotider.

30

5.

Nukleotidsekvensen ifølge ethvert av kravene 1 – 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den har nukleotidsekvensen vist i
Seq. Id. Nr. 1 eller en subsekvens derav som har en størrelse på minst 15 nukleotider.

35

6.

En replikerbar ekspresjonsvektor som bærer og som er i stand til å formidle ekspresjonen av en nukleotidsekvens som definert i et hvilket som helst av kravene 1 –

5. 5

7.

Replikerbar ekspresjonsvektor kalt pS507,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den har blitt deponert 11. mai 1993 i Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) under

10 aksesjonsnummeret DSM 8282 i overensstemmelse med Budapest-overenskommelsen.

8.

Plasmid kalt pS500, k a r a k t e r i s e r t v e d at det har blitt deponert 11 mai 1993 i Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

15 GmbH (DSM) under aksesjonsnummeret DSM 8281 i overensstemmelse med Budapest-overenskomsten.

9.

Vertscelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den bærer en

20 ekspresjonsvektor ifølge krav 6.

10.

Fremgangsmåte for å produsere et polypeptid ifølge krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter følgende trinn:

25

f) innsetting av en nukleotidsekvens som definert i et hvilket som helst av kravene 1 - 5 i en ekspresjonsvektor,

g) å transformere en egnet ikke-human vertsorganisme med vektoren produsert i trinn a),

30 h) dyrke vertsorganismen produsert i trinn (b) under egnede betingelser for å uttrykke polypeptidet,

i) høste polypeptidet, og

j) eventuelt utsette polypeptidet for post-translasjonell modifisering.

35 11.

Fremgangsmåten ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at polypeptidet som produseres blir isolert ved en fremgangsmåte som omfatter én eller

flere trinn som affinitetskromatografi ved å bruke immobilisert nativ eller rekombinant SCCE-polypeptid eller antistoffer reaktive med nevnte polypeptid og/eller andre kromatografiske og elektroforetiske prosedyrer.

5 12.

Anvendelse av et polypeptid ifølge krav 1 som et kosmetisk produkt.

13.

10 Anvendelse av et polypeptid som definert i krav 1 for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling eller profylakse av kviser, xeroderma eller andre hyperkeratotiske tilstander slik som kallositeter og keratose pilaris.

14.

15 Anvendelse av et polypeptid som definert i krav 1 for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling eller profylakse av forskjellige iktyoser, kviser, psoriasis eller andre inflammatoriske hudsykdommer slik som eksemer.

15.

Fremgangsmåte for identifisering av en forbindelse,

20 k a r a k t e r i s e r t v e d at den har en effekt på enzymatisk effekt av nativt SCCE som har aminosyresekvensen 1 – 224 fra Seq. Id. Nr. 2 som omfatter anvendelse av polypeptidet som definert i krav 1.

16.

25 Fremgangsmåten ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at den identifiserer en forbindelse som har en inhibitorisk effekt på den enzymatiske effekten til nativt SCCE som har aminosyresekvensen 1 – 224 fra Seq. Id. Nr. 2.

17.

30 Fremgangsmåten ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at den identifiserer en forbindelse som er i stand til å forsterke den enzymatiske aktiviteten til nativt eller rekombinant SCCE som har aminosyresekvensen 1- 224 fra Seq. Id. Nr. 2.

18.

35 Fremgangsmåte for identifisering av en forbindelse som er i stand til å konvertere proenzymformen av SCCE, k a r a k t e r i s e r t v e d at den

har aminosyresekvensen -7 – 224 fra Seq. Id. Nr. 2 til aktivt SCCE som har aminosyresekvensen 1 - 224 fra Seq. Id. Nr. 2 som omfatter anvendelsen av polypeptidet som definert i krav 1.

5 19.

Diagnostisk middel, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et anti-stoff med spesifisitet for et polypeptid som definert i krav 1.

20.

10 Diagnostisk middel, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er i stand til å detektere en nukleotidsekvens ifølge krav 1 og som

- c) er en subsekvens av en sekvens ifølge krav 1, som har en størrelse på minst 15 nukleotider; eller
- 15 d) som hybridiserer med sekvensen vist i Seq. Id. Nr. 1 under høystringente betingelser og har en størrelse på minst 15 nukleotider.

21.

Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et polypeptid som definert i krav 1 som foreligger på en form som er egnet for topisk administrering valgt fra gruppen bestående av en krem, en salve, en lotion, et liniment, en gel, en pasta, en "stick", en spray, en sjampo, en såpe, en hår-"conditioner" og et pulver.

25 22.

Kosmetisk eller hudpreparatsammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter polypeptidet som definert i krav 1 på en form som er egnet for topisk administrering valgt fra gruppen bestående av en krem, en salve, en lotion, et liniment, en gel, en pasta, en "stick", en spray, en sjampo, en såpe, en hår-"conditioner" og et pulver.

30

1/23

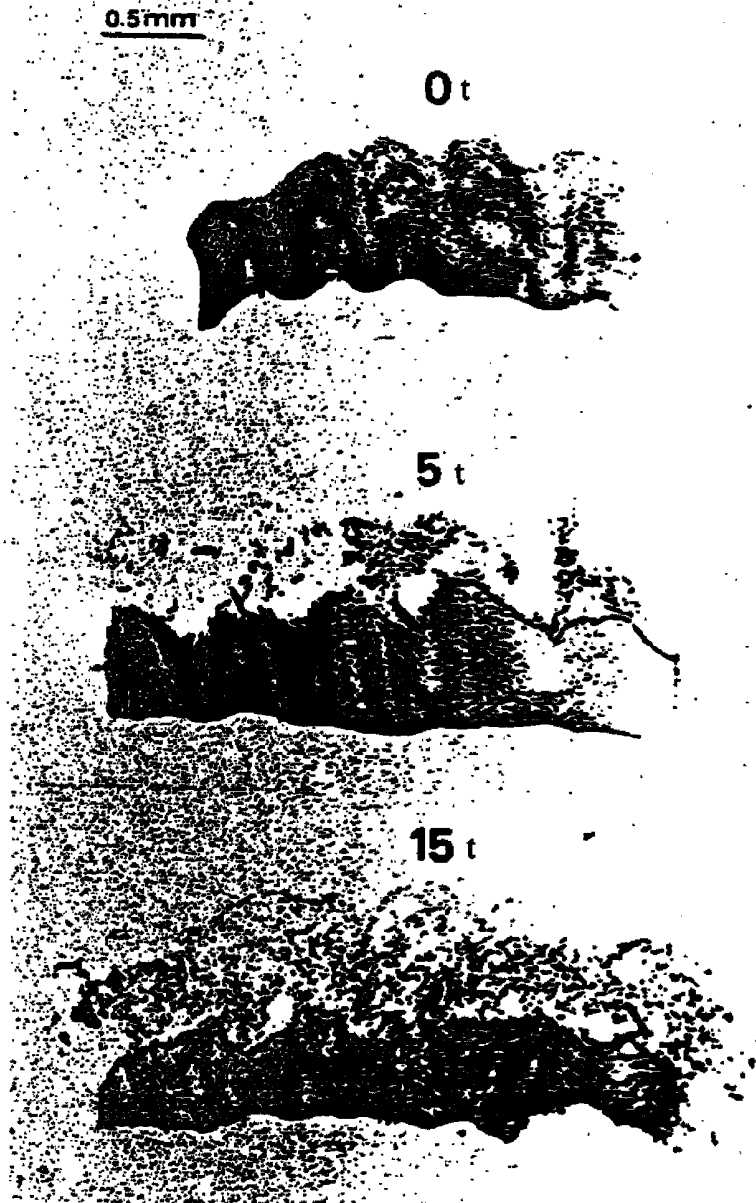


Fig. 1

2/23

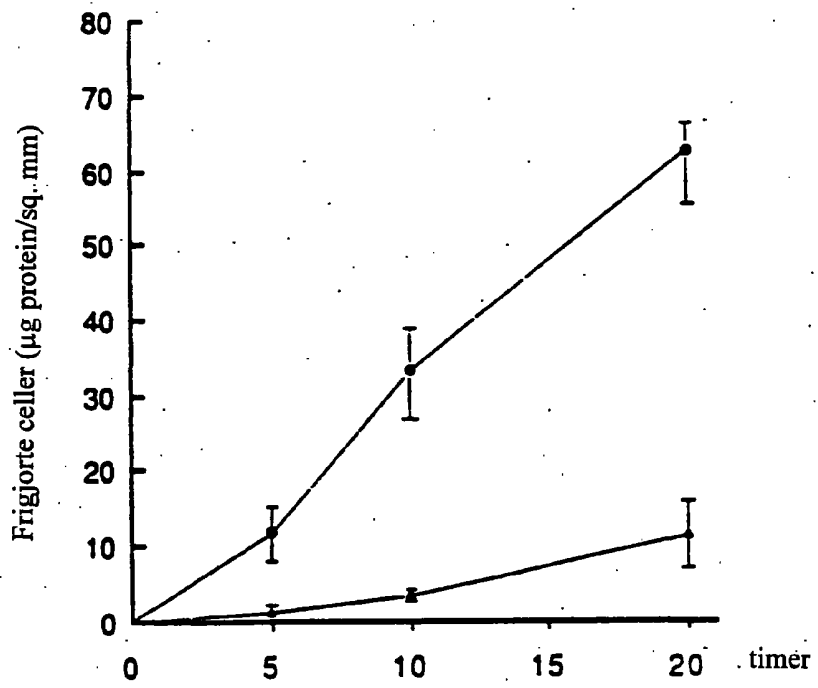


Fig. 2

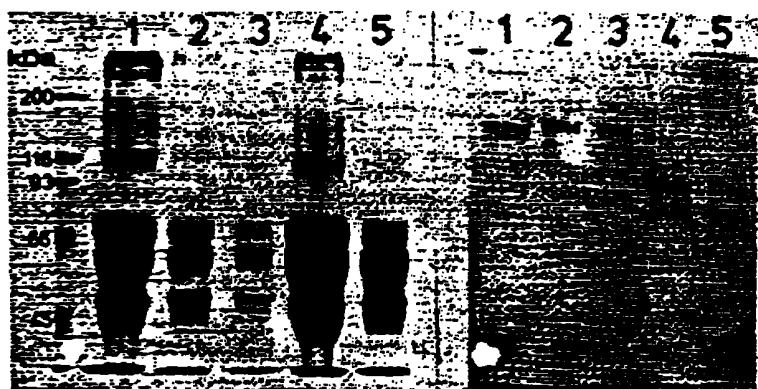


Fig. 3A

Fig. 3B

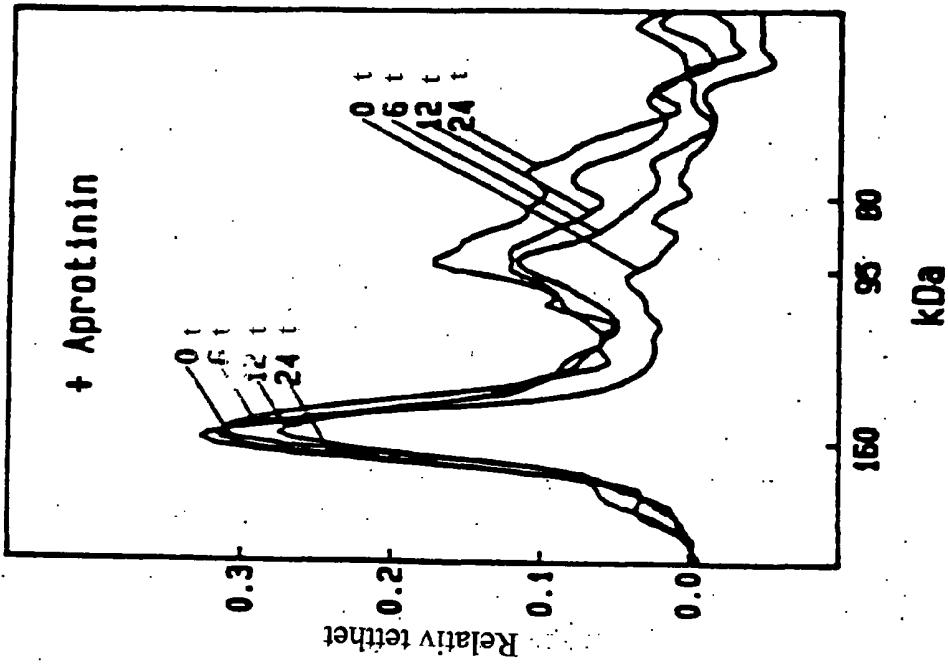


Fig. 4B

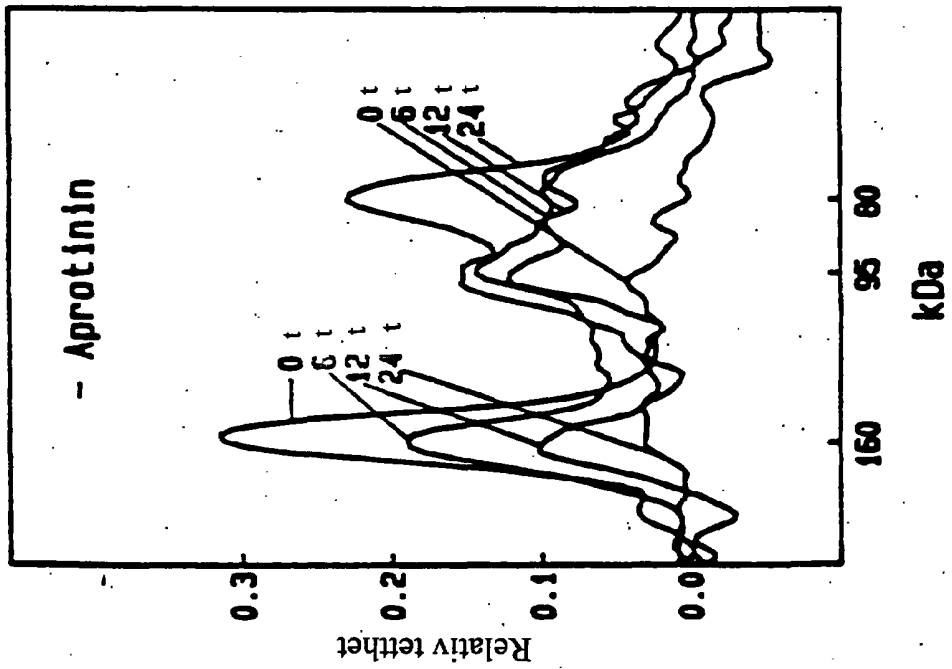


Fig. 4A

5/23

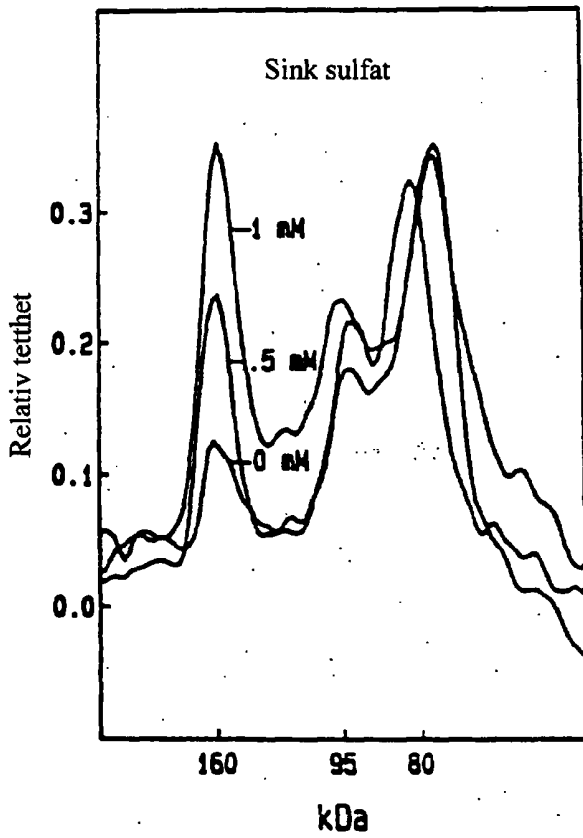


Fig. 5A

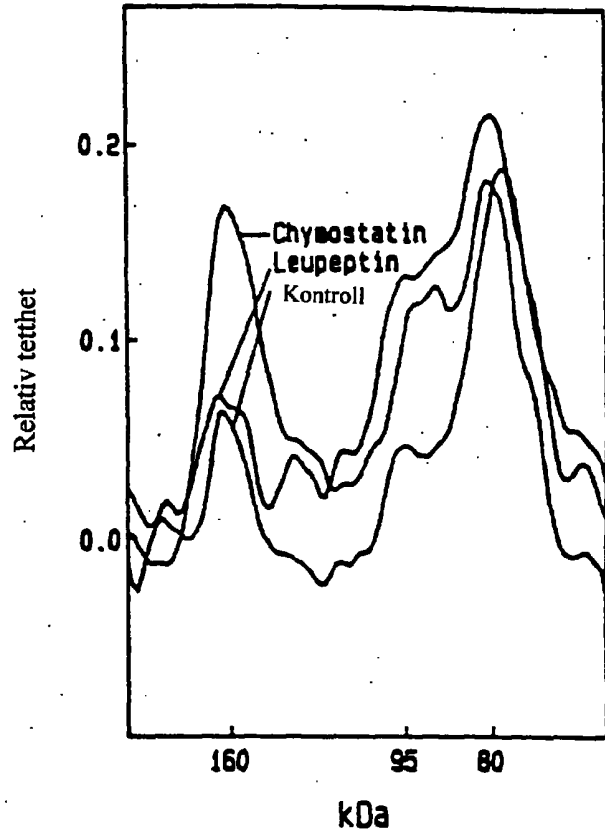


Fig. 5B

6/23

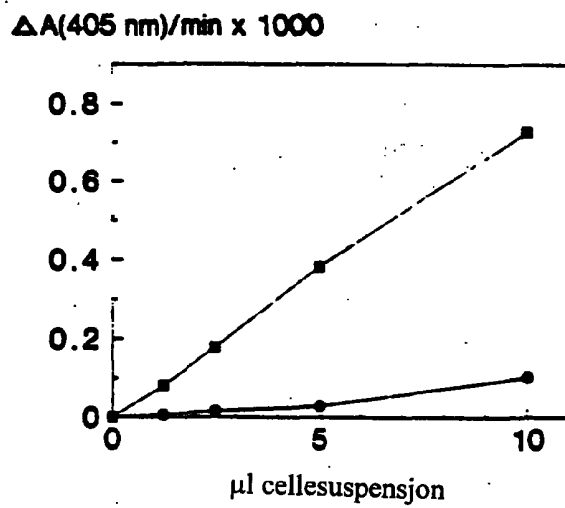


Fig. 6

7/23

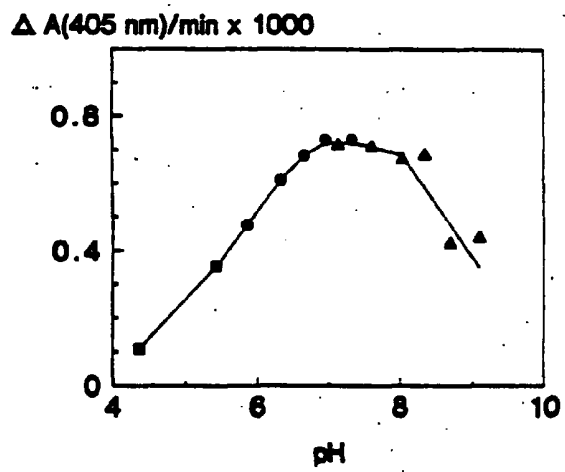


Fig. 7

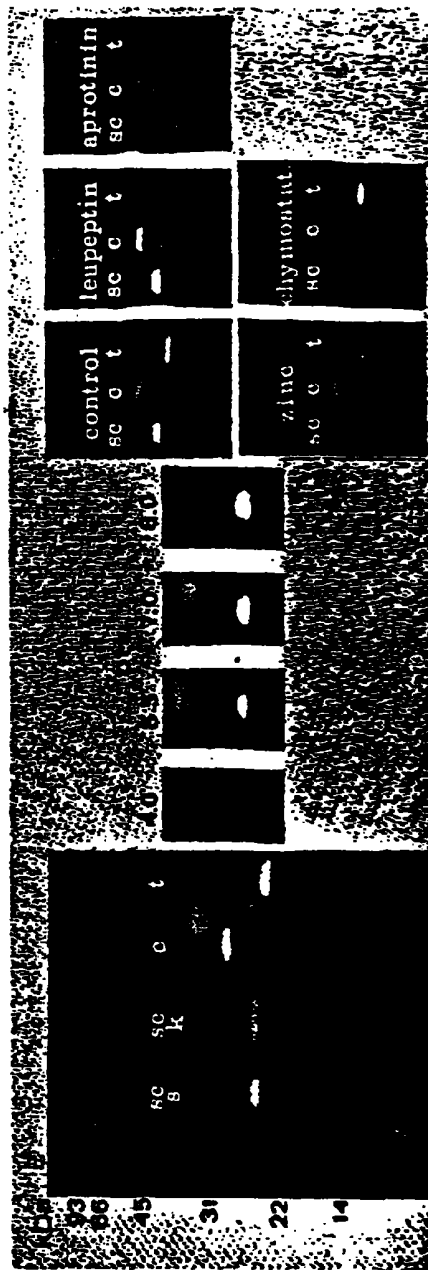


Fig. 8A Fig. 8B Fig. 8C

9/23

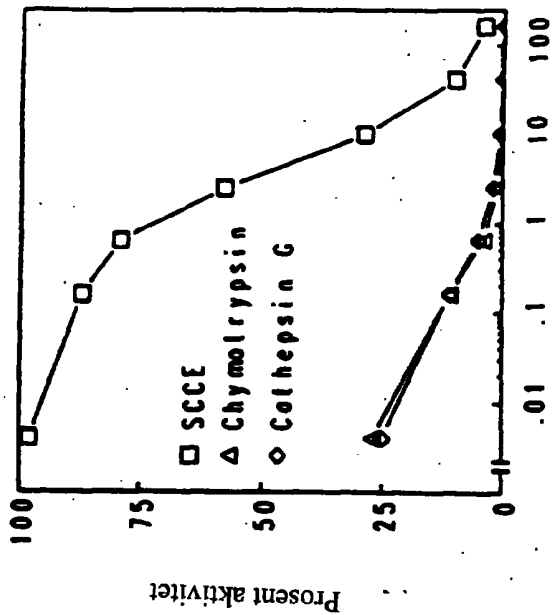


Fig. 9B

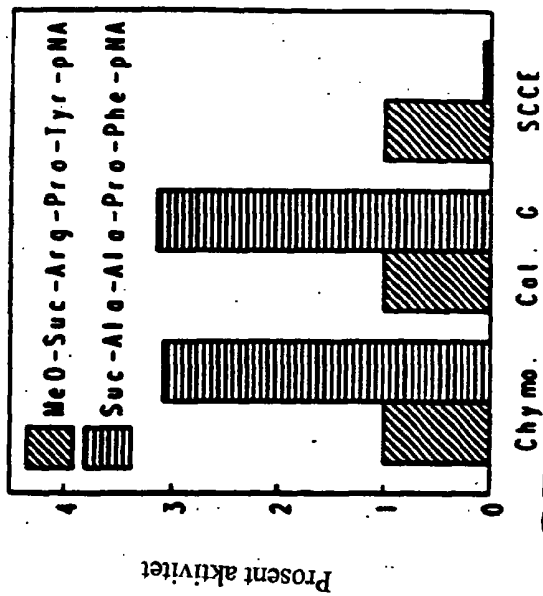


Fig. 9D

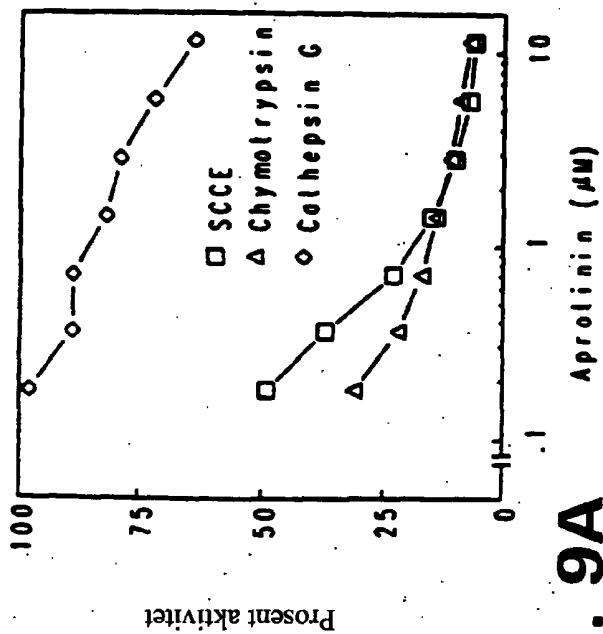


Fig. 9A

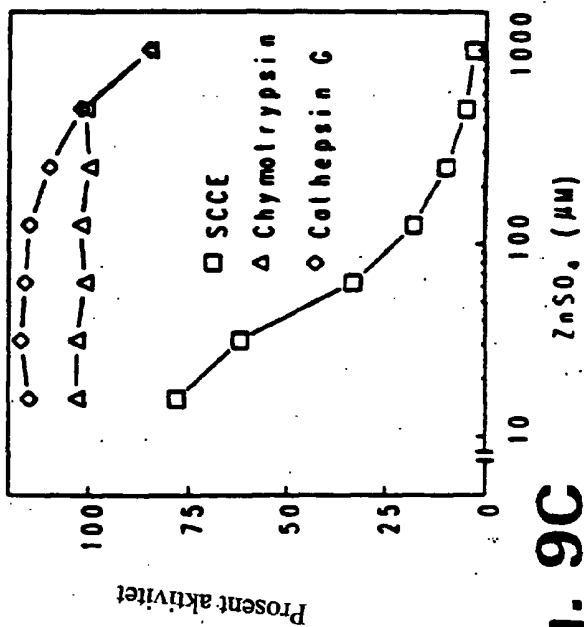


Fig. 9C

10/23

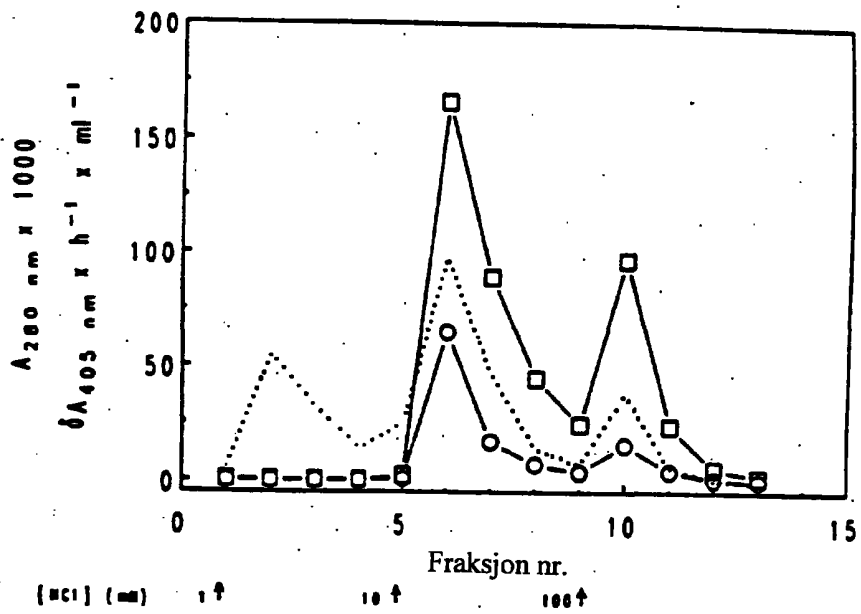


Fig. 10

11/23

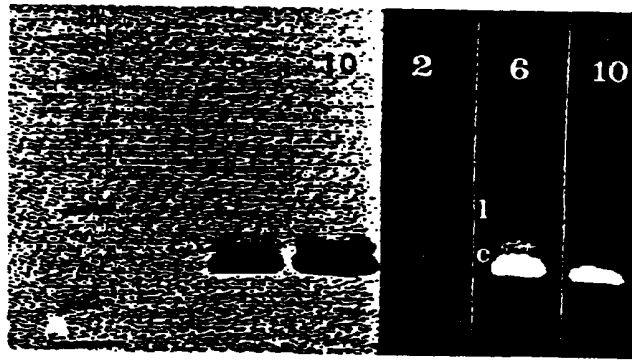


Fig. 11A **Fig. 11B**

12/23

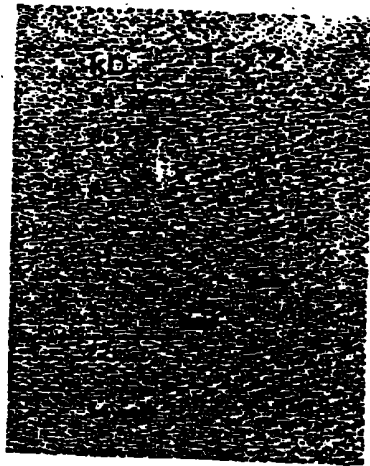


Fig. 12

14/23

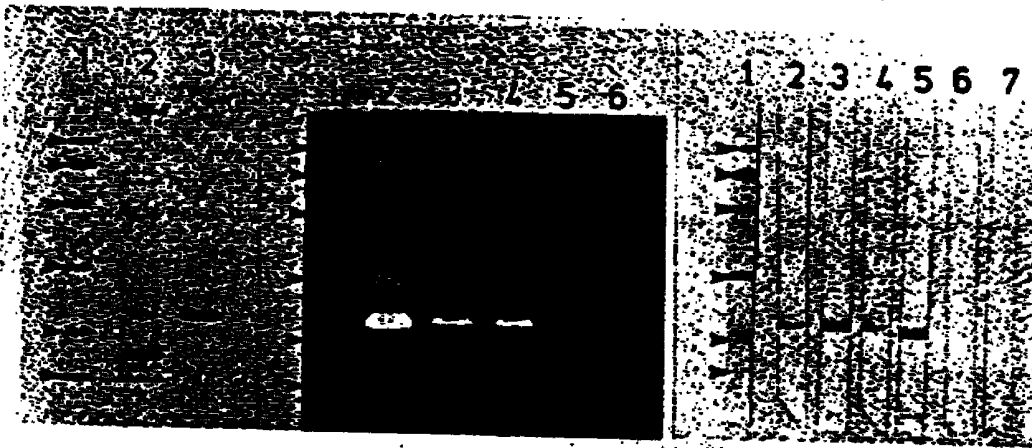


Fig. 14A

Fig. 14B

Fig. 14C

15/23

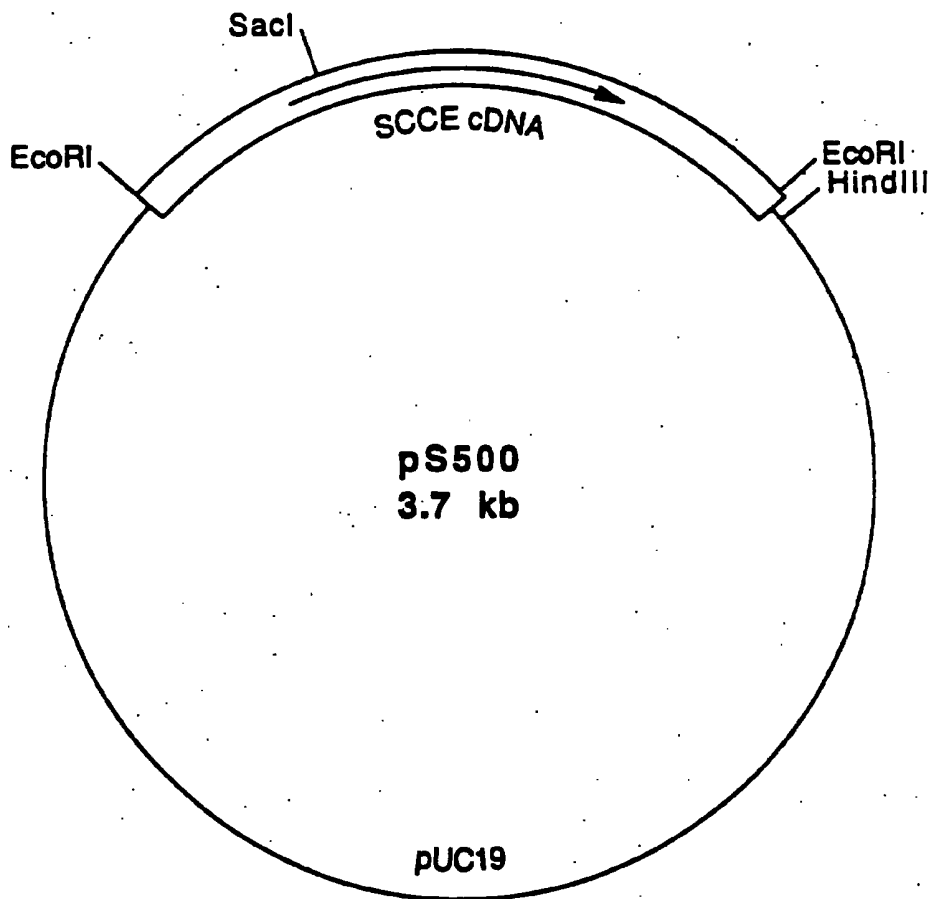


Fig. 15

16/23



Fig. 16

17/23

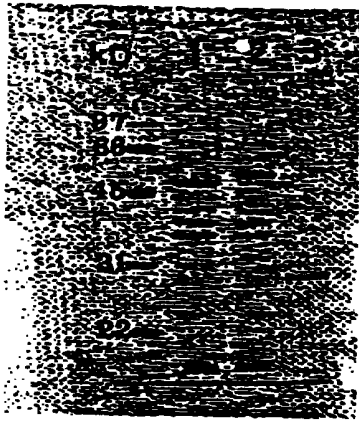


Fig. 17A

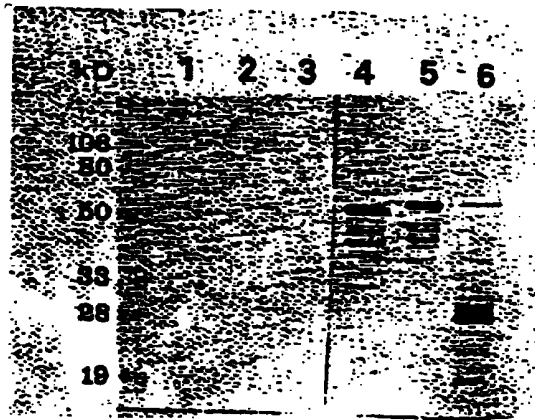


Fig. 17B

18/23

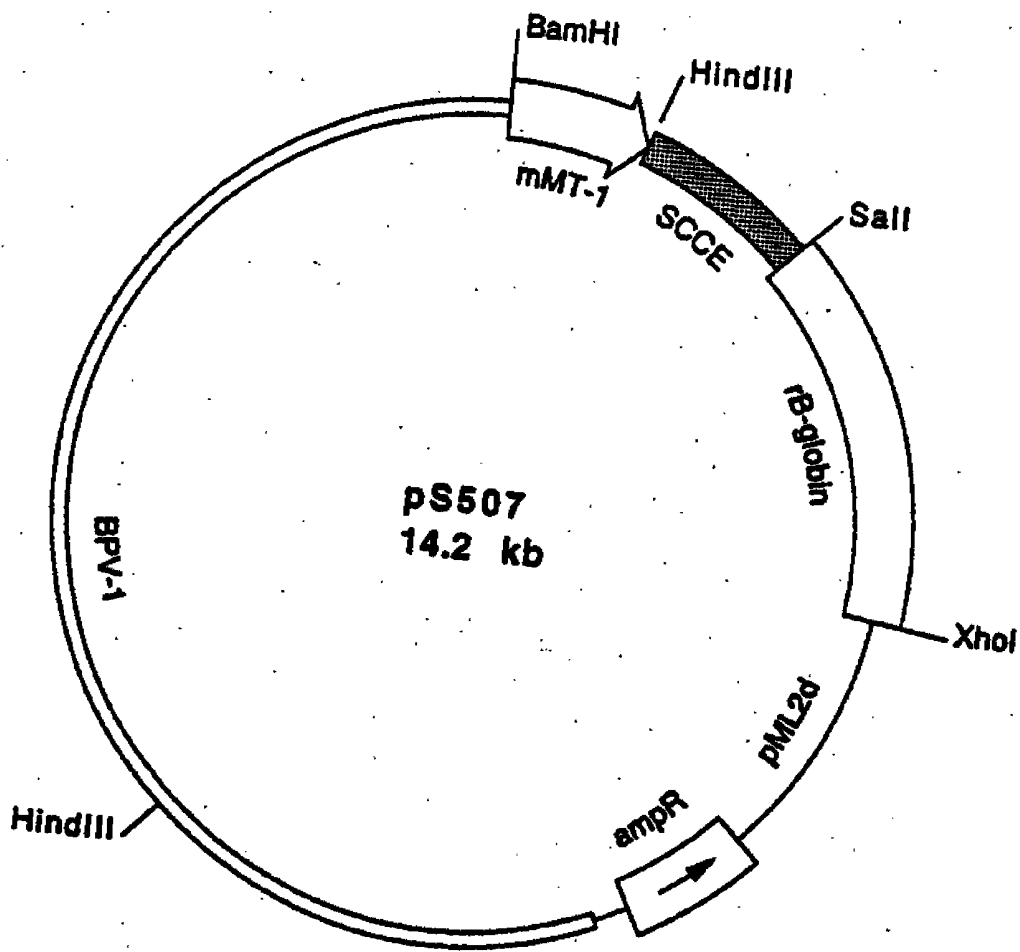


Fig. 18

19/23

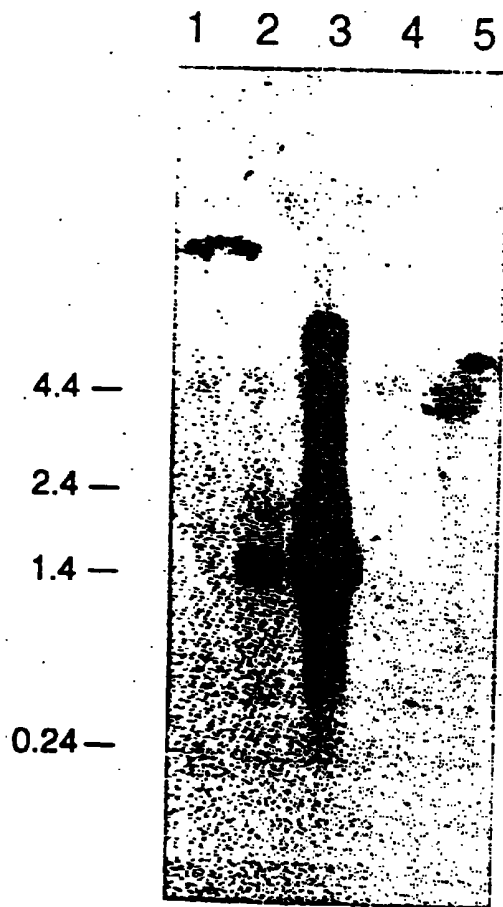


Fig. 19

20/23

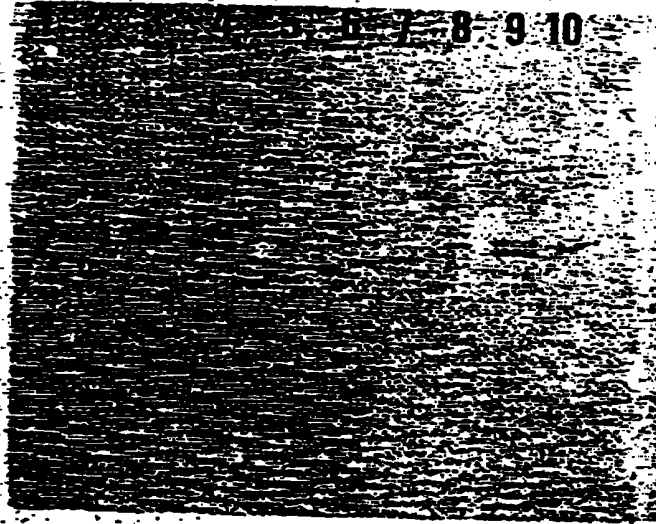


Fig. 20

21/23

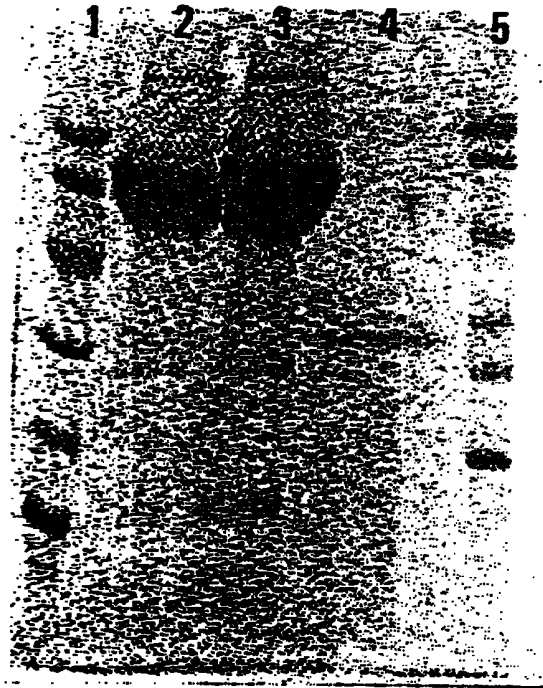


Fig. 21A

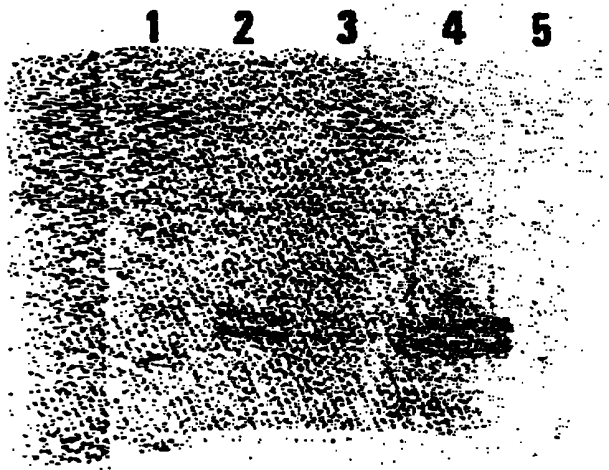


Fig. 21B

22/23



Fig. 22

23/23

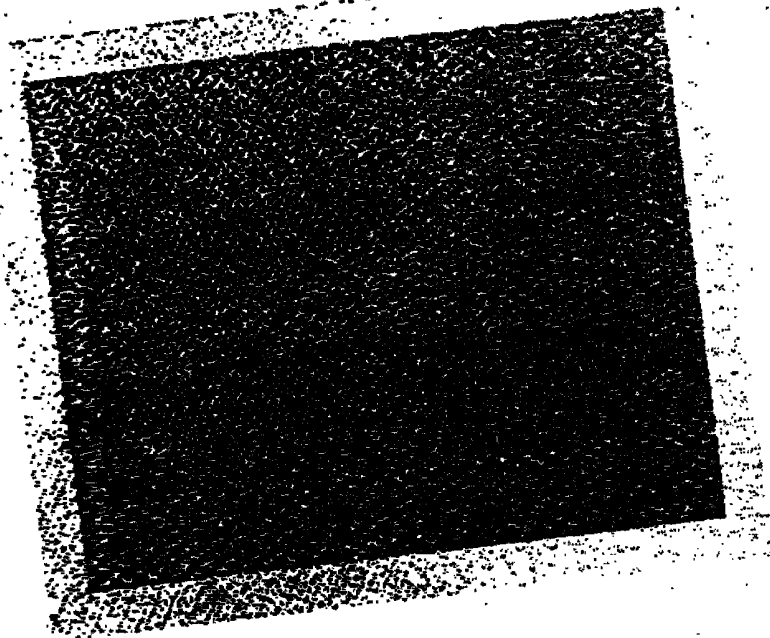


Fig. 23