

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 831484 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **831484**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -  
International patent classification  
**C12N 15/58**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **02.05.1983**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **02.05.1983**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **06.11.1983**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

05.05.1982 US 374860

14.07.1982 US 398003

(71) Hakija - Sökande - Applicant

**1 • Genentech, Inc.,** 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, CA 94080, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

**1 • Goeddel, David Vannorman,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

**2 • Kohr, William Jack,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

**3 • Pennica, Diane,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

**4 • Vehar, Gordon Allen,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

**Leitzinger Oy,** High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

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

**Ihmiskudoksen plasminogeenien aktivaattori.**

**Plasminogen aktivator för mänskovävnad.**

Ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattori. - Plasminogen aktivator för mänskövävnad.

#### Keksinnön ala

Tämän keksinnön kohteena on ihmisplasminogeenin aktivaattori, joka vastaa ihmisen seerumissa ja/tai kudoksissa löydettyä aktivaattoria, sekä sen uudet muodot ja seokset ja erityisesti keinot ja menetelmät, joilla sitä valmistetaan homogeenisesti terapeuttisesti merkittäviä määriä.

Tämä keksintö perustuu osittain ihmisplasminogeenin aktivaattorin DNA-sekvenssin ja siitä johdetun aminohapposekvenssin selvittämiseen. Tämä selvittäminen mahdollisti ihmisplasminogeenin aktivaattorin tuottamisen soveltamalla rekombinantti-DNA-tekniikkaa. Tämä vuorostaan mahdollisti laadultaan määrältään riittävän materiaalin valmistamisen niin, että voitiin aloittaa ja suorittaa markkinoille hyväksymisen vaatimat eläinkokeet ja kliiniset kokeet niiden rajoitusten estämättä, jotka luonnostaan liittyvät tähän mennessä käytettyihin eristysmenetelmiin, joihin liittyy valmistaminen ja uuttaminen olemassa olevasta soluviljelmästä. Tämän keksinnön kohteena ovat nämä suoritusmuodot kaikissa suhteissa.

Julkaisut ja muu materiaali, joilla on havainnollistettu keksinnön taustaa ja eräissä tapauksissa annettu lisää sen toteuttamista koskevia yksityiskohtia, on mainittu tässä yhteydessä viitteenä. Seuraavassa tekstissä niihin on viitattu numeroin, ja ne on vastaavasti kerätty mukaan liitettyyn viiteluetteloon.

#### Keksinnön tausta

##### A. Ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattori

Fibrinolyyttinen järjestelmä on dynaamisessa tasapainossa koagulointijärjestelmän kanssa, ja ylläpitää ehjän, näkyvän

vaskulaarikerroksen. Koagulointijärjestelmä saostaa fibriinin matriisina, jonka tarkoituksena on palauttaa hemostaattinen tila. Fibrinolyyttinen järjestelmä poistaa fibriiniverkon hemostaattisen tilan saavuttamisen jälkeen. Fibrinolyyttisen tapahtuman aiheuttaa proteolyyttinen plasmiini-entsyymi, jota muodostuu plasman prekursoriproteiinista eli plasminogeenista. Aktivaattorin aikaansaama aktivointi muuntaa plasminogeenin plasmiiniksi.

Tällä hetkellä kaupallisesti on saatavissa kahta aktivaattoria, nimittäin streptokinaasia ja urokinaasia. Kummankin käyttöindikaatioita ovat akuuttien vaskulaaritautien, kuten sydänlihaksen infarktin, halvauksen, keuhkoveritulpan, deep vein-tukoksen, perifeerisen valtimotukoksen ja muiden suonitukosten hoito. Nämä taudit muodostavat yhdessä suuren terveysvaaran ja riskin.

Näiden tautien takana oleva etiologinen pohja viittaa joko verihyytymän - trombi tai trombiembolus - aiheuttamaan verisuonen osittaiseen tai vakavissa tapauksissa täydelliseen tukkeutumiseen. Perinteinen antikoagulanttihoito esimerkiksi hepariinilla tai kumariinilla ei lainkaan suoraan edistä trombien tai trombiembolusten liukenemistä. Edellä mainittuja trombolyyttisiä aineita, nimittäin streptokinaasia ja urokinaasia on käytetty käytännössä tehokkaasti. Niillä kummallakin on kuitenkin vakavia rajoituksia. Kummallakaan ei ole suurta affiniteettia fibriinin suhteen; kumpikin aktivoi siten jokseenkin valikoimatta kiertävää ja fibriiniin sidottua plasminogeenia. Kiertävässä veressä muodostunut plasmiini neutraloituu melko nopeasti eikä ole enää käytettävissä hyödyllisessä trombolyyssissä. Jäljelle jäänyt plasmiini hajottaa useita hyytymiä aiheuttavia proteiineja, esimerkiksi fibrinogeeniä, Factori V and Factori VIII proteiineja, mikä aiheuttaa verenvuotovaaran. Streptokinaasi on lisäksi voimakkaan antigeeninen ja potilaat, joilla on korkeat vasta-ainetiitterit, reagoivat liian huonosti hoitoon eikä heitä voida pitkää jatkuvassa hoidossa. Urokinaasihoito on kallista,

koska se eristetään ihmisen virtsasta tai kudosisviljelmästä, eikä sitä ole sen vuoksi yleisesti hyväksytty kliniseen käyttöön. Urokinaasi on ollut lukuisten tutkimusten kohde - kts. esimerkiksi viitteet 1-6.

Nk. plasminogeenin aktivaattoreita on eristetty erilaisista ihmiskudoksista, esimerkiksi kohdun kudoksesta, verestä, seerumista - kts. yleisesti viitteet 7-11, ja soluviljelmästä (viite 94). Myös niiden seoksia on kuvattu - kts. viitteet 12, 13. Kts. myös viitteet 14-18. Näistä lähteistä saadut plasminogeenin aktivaattorit on ryhmitelty kahteen pääryhmään: Urokinaasityyppiset plasminogeenin aktivaattorit (u-PA) ja kudostyyppiset plasminogeenin aktivaattorit (t-PA) niiden immunologisten ominaisuuksien erojen perusteella. (Lyhennelmiä t-PA ja u-PA on ehdotettu käytettäväksi seuraavassa kokouksessa: the XXVIII Meeting of the International Committee on Thrombosis and Hemostasis, Bergamo, Italia, 27.7.1982).

Äskettäin on tunnistettu ihmisen melanoomalinja, joka erittää t-PA-aktivaattoria. Tämän melanoomaplasminogeenin aktivaattorin karakterisointi on osoittanut, että sekä immunologisesti että aminohappokoostumuksensa perusteella sitä ei voida erottaa normaalista ihmiskudoksesta eristetystä plasminogeenin aktivaattorista (viitteet 19, 88).

Tämä tuote eristettiin suhteellisen puhtaassa muodossa, karakterisoitiin ja todettiin erittäin aktiiviseksi fibrinolyyttiseksi aineeksi (20).

Useat tutkimukset (esimerkiksi viitteet 95-98), joissa käytettiin melanoomasolulinjasta puhdistettua t-PA-aktivaattoria, ovat osoittaneet sillä olevan suuremman affiniteetin fibriiniin kuin urokinaasi-tyyppisillä plasminogeenin aktivaattoreilla. Ihmisen t-PA-aktivaattoria potentiaalisena trombolyyttisenä aineena ei ole kuitenkaan voitu tehokkaammin tutkia, koska sen esteenä on ollut sen erittäin alhainen konsentraatio veressä, kudosisuutteissa, suoniperfusaateissa

ja soluviljelmissä.

Rekombinantti-DNA-tekniikan ja siihen liittyvien tekniikoiden soveltamisen uskottiin olevan kaikkein tehokkaimman tavan saada tarvittavat suuret määrät korkealaatuista ihmiskudostyyppistä plasminogeenin aktivaattoria (josta aikaisemmin käytettiin nimitystä ihmisplasminogeenin aktivaattori), jossa oleellisesti ei ole muuta ihmisproteiinia. Tällaisilla aineilla uskottiin olevan todennäköisesti bioaktiivisuutta, mikä mahdollistaisi niiden kliinisen käytön erilaisten kardiovaskulaaristen tilojen tai tautien hoidossa.

18  
Soluviljelmät tuottavat tyydyttäviä määriä ihmisen t-PA-aktivaattoria. Myöhemmillä käsittelyillä, joissa käytetään sekundääristä koodaussekvenssiä, voidaan kuitenkin vieläkin lisätä tuottomääriä. Sekundäärinen koodaussekvenssi käsittää dihydrofolaattireduktaasin (DHFR), johon vaikuttaa ulkoisesti säädettävissä oleva parametri, kuten metotreksaatti, jolloin ekspressiota voidaan kontrolloida säätämällä metotreksaatin (MTX) konsentraatiota.

## B. Rekombinantti-DNA-tekniikka

Rekombinantti-DNA-tekniikka on jo kehittynyt melko monimutkaiseksi. Molekyylibiologit pystyvät jonkin verran yhdistämään erilaisia DNA-sekvenssejä muodostaen uusia DNA-aineita, jotka pystyvät tuottamaan suuria määriä heksogeenista proteiinia transformoiduissa mikrobeissa ja soluviljelmissä. Käytettävissä on yleisiä keinoja ja menetelmiä, joilla in vitro ligatoidaan erilaisia tasapäisiä tai päiltään "tarttuvia" DNA-fragmentteja, jolloin saadaan tehokkaita ekspressiovälittäjiä, jotka ovat hyödyllisiä tiettyjen organismien transformoinnissa ja näin ohjataan niiden halutun eksogeenisen tuotteen tehokasta synteesiä. Yksittäisen tuotteen kannalta reitit ovat jonkin verran hankalia eikä tiede ole vielä edennyt aiheeseen, jossa onnistuminen voidaan aina ennustaa. Itse asiassa ne, jotka ennustavat onnistumisia ilman kokeellista pohjaa, tekevät näin huomattavalla riskillä.

Oleellisten osien DNA-rekombinaatio, so. replikaation lähtökohta, yhden tai useamman fenotyypin valintaominaisuudet, ekspressio-promoottori, heterologinen geeni-insertti ja vektorin loppuosa, tehdään yleensä isäntäsolun ulkopuolella. Saatu replikoitava rekombinantti-ekspressiovälittäjä eli plasmidi viedään soluihin transformoimalla ja rekombinantti-välittäjää saadaan suuret määrät kasvattamalla transformanttia. Kun geeni on oikein insertoitu niiden osien suhteen, jotka valvovat koodatun DNA-tiedon transkriptiota ja translaatiota, saatu ekspressiovälittäjä on hyödyllinen ja todella tuottaa polypeptidisekvenssiä, jota insertoitu geeni koodaa. Tätä tapahtumaa kutsutaan ekspressioksi. Saatu tuote voidaan saada tarvittaessa lyysaamalla isäntäsolu mikrobijärjestelmissä ja ottamalla tuote talteen puhdistamalla sopivalla tavalla muista proteiineista.

Käytännössä käytännössä rekombinantti-DNA-tekniikalla voidaan ekspressoida täysin heterologisia polypeptidejä - nk. suora ekspressio - tai vaihtoehtoisesti voidaan ekspressoida heterologinen polypeptidi, joka on sulautunut homologisen polypeptidin aminohapposekvenssin johonkin osaan. Jälkimmäisissä tapauksissa aiottu bioaktiivinen tuote ei aina ole bioaktiivinen fuusiotuneessa, homologisessa/heterologisessa polypeptidissä, ennenkuin se lohkaistaan solun ulkopuolisessa ympäristössä. Kts. viitteet (21) ja (22).

Myös solu- tai kudosisviljelmien käyttö genetiikan ja solufysiologian tutkimuksessa on pitkälle vakiintunut. Käytettävissä on keinoja ja menetelmiä, joilla ylläpidetään pysyvät solulinjat, jotka on valmistettu siirrostamalla peräkkäin eristetyistä normaaleista soluista. Tutkimuskäyttöä varten tällaisia solulinjoja ylläpidetään kiinteällä tukiaineella nestemäisessä alustassa tai niitä kasvatetaan tarvittavia ravinteita sisältävässä suspensiossa. Scale-up suuriin valmistemääriin näyttää asettavan vain mekaanisia vaikeuksia. Taustatietoja varten viitataan viitteisiin (23) ja (24).

Samoin proteiinibiokemia on hyödyllinen ja itse asiassa välttä-



Missing

page/

pages

viljelmillä, mahdollistaa ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattorin tuottamisen paljon tehokkaammalla tavalla kuin mitä on ollut mahdollista ja näin vaikeasti saavutettavissa olleen kaupallisen hyödyntämisen. Isäntäsolusta riippuen ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattori voi lisäksi omata suuremman tai pienemmän määrän siihen liittyvää glykolisaatiota verrattuna natiiviin materiaaliin. Kaikissa näissä tapauksissa t-PA ei sisällä kontaminanteja, joita tavallisesti liittyy sen solu ympäristöön ei-rekombinantti-muodossa.

Tämän keksinnön kohteena ovat myös replikoitavat DNA-ekspressiovälittäjät, joissa on ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattoria koodaavat geenisekvenssit ekspressoituvassa muodossa, näillä transformoidut mikro-organismikannat tai soluviljelmät ja tällaisten transformoitujen kantojen tai viljelmien mikrobi- tai soluviljelmät, jotka pystyvät tuottamaan ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattoria. Tämän keksinnön kohteena ovat myös erilaiset menetelmät, jotka ovat hyödyllisiä näiden geenisekvenssien, DNA-ekspressiovälittäjien, mikro-organismikantojen ja soluviljelmien valmistuksessa, ja niiden spesifiset suoritusmuodot. Tämän keksinnön kohteena on lisäksi näiden mikro-organismien ja soluviljelmien fermentaatioviljelmien valmistaminen.

#### Lyhyt kuvaus piirustuksista

(*natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigelelektroforeesi*)

Kuviossa 1 on esitetty 10-prosenttinen (SDS-sivu) <sup>35</sup>S-leimatuista proteiineista, jotka voidaan saostaa melanoomasoluista <sup>eritetyillä</sup> proteiineilla anti-t-PA-IgG:llä, proteaasi-inhibiittorin kanssa ja ilman sitä.

Kuviossa 2 on esitetty elektroforeesiajo melanoomasoluista saatujen mRNA-jakeiden immunosaostetuista translatiotuotteista.

- Kuviossa 3 on esitetty hybridisaatiokuvio 96<sup>bakteeri-</sup>pesäkkeestä, jotka on transformoitu cDNA:lla käyttämällä <sup>32</sup>P-leimattua 14-mer poolia koettimena, joka on valmistettu ihmisen t-PA-aktivaattorin 5 aminohapposekvenssin pohjalta.
- Kuvio 4 on restriktioendonukleaasikartta täyspitkästä ihmisten t-PA-cDNA:sta.
- Kuvioissa 5a, 5b ja 5c on esitetty täyspitkän ihmisen t-PA-cDNA:n nukleotidisekvenssi ja siitä johdettu aminohapposekvenssi.
- Kuvio 6 esittää kaaviollisesti ekspressioplasmidin p $\Delta$ RIPA<sup>0</sup> muodostamista. /
- Kuviossa 7 on esitetty tulokset fibriinimaljamenetelmästä, jolla on määritetty p $\Delta$ RIPA<sup>0</sup>-plasmidilla transformoitujen solujen fibrinolyyttinen aktiivisuus. /  
E. coli
- Kuvio 8 on HPLC-käyrä peptideistä, jotka on saatu digestoimalla trypsiinillä t-PA-aktivaattoria.
- Kuvio 9 esittää plasmidin, joka koodaa valmiin ihmisen t-PA-aktivaattorin suoraa ekspressiota E. coli-bakteerissa, muodostamista.
- Kuviossa 10 on esitetty tulokset fibriinimaljamenetelmästä, jolla on määritetty ihmisen t-PA-aktivaattorin, joka on valmistettu transformoimalla E. coli pt-PAt<sub>trp12</sub>-plasmidilla, fibrinolyyttinen aktiivisuus.
- Kuviossa 11 on esitetty DHFR-proteiini (mutantti tai villityyppi)/t-PA-aktivaattoria koodaavien plasmidien, jotka sopivat nisäkkäiden kudosisviljelmäsolujen transformointiin, muodostaminen.



Missing

page/

pages

## B Isäntäsoluviljelmät ja vektorit

Tässä esitettyjä vektoreita ja menetelmiä voidaan käyttää isäntäsoluissa, jotka kuuluvat laajaan joukkoon prokaryoottisia ja eukaryoottisia organismeja.

Keksinnössä hyödyllisten vektoreiden muodostamisessa käytetään DNA-sekvenssien kloonaukseen yleensä luonnollisesti mieluummin prokaroyytteja. Erityisen hyödyllinen on esimerkiksi E.coli K12 kanta 294 (ATCC n:o 31446). Muita käyttökelpoisia mikrobikantoja ovat esimerkiksi E.coli kannat, kuten E.coli B ja E.coli X1776 (ATTC n:o 31537). Nämä esimerkit ovat luonnollisesti havainnollistavia (eivätkä rajoittavia).

Prokaroyyttejä voidaan käyttää myös ekspressoimiseen. Käyttökelpoisia ovat edellä mainitut kannat sekä E.coli W3110 ( $F^-$ ,  $\lambda^-$ , protrofinen, ATTC n:o 27325), basillit, kuten Bacillus subtilis ja muut enterobakteerit, kuten Salmonella typhimurium tai Serratia marcescens ja erilaiset pseudomonas-lajit.

Näiden isäntien yhteydessä käytetään yleensä plasmidivektoreita, jotka sisältävät replikoni- ja kontrollisekvenssejä, jotka ovat peräisin isäntäsolun kanssa yhteensopivista lajeista. Vektorissa on tavallisesti replikaatiokohta sekä markkeeraussekvenssejä, jotka voivat saada aikaan fenotyypipiselektion transformoiduissa soluissa. Esimerkiksi E.coli transformoidaan tyypillisesti käyttämällä pBR 322-plasmidia, joka on peräisin E.coli lajeista (Bolivar, et al., Gene 2: 95 (1977)). pBR322 plasmidissa on geenit ampicilliinin ja tetrasykliinin vastustuskyvylle ja siten se on helppo keino tunnistaa transformoidut solut. pBR322-plasmidin tai jonkin muun mikrobiplasmidin on myös sisällettävä - tai se on modifioitava näin tekemään - promoottoreita, joita mikrobiorganismi voi käyttää ekspressoimaan omat proteiininnsa. Näihin rekombinantti-DNA-konstruktiossa yleisimmin käytettyihin promoottoreihin kuuluvat  $\beta$ -laktamaasi



Missing

page/

pages

(Simian Virus 40). SV40-viruksen alku- ja loppupromoottorit ovat erityisen hyödyllisiä, koska kummatkin saadaan viruksesta helposti fragmenttina, joka sisältää myös SV40-viruksen replikaation replikaatiokohdan (Fiers, et al, Nature, 273: 113 (1978); mainittu tässä viitteenä. Voidaan käyttää myös pienempiä tai suurempi SV40-fragmentteja edellyttäen, että niihin sisältyy noin 250 bp sekvenssin, joka ulottuu kohdasta Hind III viruksen replikaation alkukohdassa sijaitsevaan Bgl I- kohtaan päin. Lisäksi on myös mahdollista ja usein toivottavaakin käyttää haluttuun geenisekvenssiin normaalisti liittyviä promoottori- tai kontrollisekvenssejä edellyttäen, että nämä kontrollisekvenssit sopivat yhteen isäntäsolusysteemin kanssa.

Replikaation alkukohta voidaan saada joko muodostamalla vektori niin, että se sisältää ulkoisen alkukohdan, esimerkiksi alkukohdan, joka on saatu SV40-viruksesta tai muusta viruksesta (esimerkiksi Polyoma, Adeno, VSV, BPV jne.), tai sen voi muodostaa isäntäsolun kromosomaalinen replikaatiomekanismi. Jos vektori integroidaan isäntäsolun kromosomiin, jälkimmäinen on usein riittävä.

Kun keksinnön mukaisilla vektoreilla, jotka sisältävät sekä t-PA-aktivaattoria että DHFR-proteiinia koodaavat DNA-sekvenssit, tapahtuvaa transvektiota varten valitaan hyvänä pidetty isäntäsolu, on tarkoituksenmukaista valita isäntä käytetyn DHFR-proteiinin tyyppin perusteella. Jos käytetään villityypistä DHFR-proteiinia, valitaan parhaiten isäntäsolu, joka on DHFR-proteiinin suhteen vajaa. Näin on mahdollista käyttää DHFR-proteiinia koodaavaa sekvenssiä onnistuneen transfektion markerina selektiivisellä alustalla, josta puuttuu hypoksantiini, glysiini ja tymidiini. Tässä tapauksessa eräs sopiva isäntäsolu on CHO (Chinese hamster ovary)-solulinja, joka on vajaa DHFR-aktiivisuuden suhteen ja joka on valmistettu ja kasvatettu Urlaub'in ja Chasin'in kuvaamalla tavalla, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77: 4216 (1980); julkaisu on esitetty tässä viitteenä.

Jos toisaalta kontrolloivana sekvenssinä käytetään DHFR-proteiinia, jolla on alhainen affiniteetti metotreksiiniin, ei ole välttämätöntä käyttää DHFR-<sup>vajaita</sup>~~resistenttejä~~ soluja. Koska mutantti-DHFR on resistentti metotreksaatile, metotreksaattia sisältäviä alustoja voidaan käyttää valintakeinona edellyttäen, että itse isäntäsolut ovat metotreksaatile herkkiä. Useimmat eukaryotiset solut, jotka kykenevät absorboimaan metotreksaattia, näyttävät olevan MTX-herkkiä. Eräs tällainen hyödyllinen solulinja on CHO-linja, CHO-K1 ATCC n:o CCL 61.

Jäljempänä esitetyt esimerkit kuvaavat E.coli-bakteerin, kun promoottorisysteeminä <sup>lac ja</sup> on trp, käyttöä sekä CHO-solujen käyttöä isäntäsoluina ja ekspressiovektoreita, jotka sisältävät promoottorina SV40-viruksen replikaation alkukohdan. Alan ammattimies voi kuitenkin helposti käyttää analogisia menetelmiä muodostamaan ekspressiovektoreita haluttujen proteiini-sekvenssien ekspressoimiseen vaihtoehtoisissa prokaryoottisten tai eukaryoottisten isäntäsolujen viljelmissä.

### C. Käytetyt menetelmät

Jos isäntäsoluina käytetään soluja, joiden soluseinämään <sup>membrään</sup> muodostamat esteet eivät ole liian vaikeita, transfektio suoritetaan kalsiumfosfaattisaostus-menetelmällä, jota Graham ja Van der Eb ovat kuvanneet julkaisussa Virology, 52: 546 (1978). DNA:n viemiseen soluihin voidaan käyttää kuitenkin myös muita menetelmiä, kuten tumainjisointia tai protoplastifuusiota.

Jos käytetään prokaryoottisia soluja tai soluja, jotka sisältävät huomattavia soluseinämärakenteita, parhaana pidetty transfektio menetelmä on kalsiumkäsittely käyttämällä kalsiumkloridia, jota menetelmää ovat kuvanneet F.N. Cohen et al julkaisussa Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 69: 2110 (1972).

Sopivien vektoreiden, jotka sisältävät halutut koodaus- ja kontrollisekvenssit, muodostamisessa käytetään normaaleja ligatointimenetelmiä. Eristetyt plasmidit tai DNA-fragmentit lohkaistaan, sovitetaan ja ligatoidaan uudelleen haluttujen plasmidien muodostamiseksi haluttuun muotoon.

Lohkaiseminen suoritetaan käsittelemällä restriktioentsyymillä (tai -entsyymeillä) sopivassa puskurissa. Yleensä käytetään noin 1 ug plasmidia tai DNA-fragmentteja ja noin 1 yksikkö entsyymiä noin 20 µl:ssa puskuriliuosta (valmistaja antaa tiedot sopivista puskureista ja substraattimääristä kyseisille restriktioentsyymeille). Käyttökelpoinen inkubointiaika on noin 1 tunti 37°C:ssa. Inkubointien jälkeen proteiini poistetaan uuttamalla fenolilla ja kloroformilla ja nukleiinihappo otetaan talteen vesijakeesta saostamalla etanolilla.

Jos tarvitaan tasapäätt, preparaatti käsitellään 15 minuuttia 15°C:ssa 10 yksiköllä polymeraasia I (Klenow), uutetaan fenoli-kloroformilla ja saostetaan etanolilla.

Lohkaistut fragmentit jaetaan koon mukaan käyttämällä D. Geoddel'in et al, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980), kuvaamaa 6-prosenttista polyakryyliamidigeeliä; julkaisu on mainittu tässä viitteenä.

Ligatointia varten suurin piirtein yhtä suuret moolimäärät haluttuja komponentteja, joiden päät on sopivalla tavalla muokattu oikeaa yhteensopimista varten, käsitellään noin 10 yksiköllä T4 DNA-ligaasia/0,5 µg DNA. (Kun komponentteina käytetään lohkaistuja vektoreita, voi olla hyödyllistä estää halkaistun vektorin ligatoituminen uudelleen esikäsittelemällä bakteeriperäisellä alkalisella fosfataasilla).

Analyysiä varten, jolla vahvistetaan oikeat sekvenssit muodostetuissa plasmideissa, käytetään ligatointiseoksia transformoimaan E.coli K12 kanta 294 (ATCC 31446) ja sopivia transformantteja, jotka on valittu ampisilliini-<sup>ta tetrasykliini</sup>resistenttiyden perusteella, kun tämä on mahdollista. Transformanteista

immunosaostettiin tämän jälkeen ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattorille spesifisellä IgG-vasta-aineella.

5. Kyseeseen tuleva RNA (21 - 24S) muunnettiin vastaavaksi yksisäikeiseksi komplementti-DNA:ksi (cDNA), josta muodostettiin kaksisäikeinen cDNA. Poly-dC-tailing-käsittelyn jälkeen se insertoitui vektoriin, kuten plasmidiin, jossa on yksi tai useampi fenotyyppinen markeri.
6. Näin valmistetuilla vektoreilla transformoitiin bakteerisolut, jolloin saatiin cDNA-kloonikirjasto. Valmistettiin joukko (pool) radioleimattuja synteettisiä deoksioligonukleotidejä, jotka olivat komplementaarisia t-PA-aktivaattorin tunnettujen aminohapposekvenssien kodoneille, kuten esimerkiksi joukko 8 14-meerejä, 5'-dTC(<sup>A</sup><sub>G</sub>)CA(<sup>A</sup><sub>G</sub>)TA(<sup>C</sup><sub>T</sub>)TCCA-3' (komplementaarinen sekvensseille, jotka koodaavat tunnettua - kts. infra-aminohapposekvenssiä: tryptofaani - glutamiinihappo - tyrosiini - kysteiini - asparagiinihappo (W-E-Y-C-D), ja käytettiin pesäkekirjaston koettimena.
7. Positiivisista cDNA-klooneista eristettiin ja sekvenssoitiin plasmidi-DNA.
8. Tämän jälkeen t-PA-koodaava sekvenssoitu DNA in vitro niin, että se voitiin insertoida sopivaan ekspressiovälittäjään, jota käytettiin transformoimaan kyseeseen tuleva isäntäsolu, jonka vuorostaan annettiin kasvaa viljelmässä ja tuottaa haluttua ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattoria.
9. Näin tuotetussa ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattorin entsyymaattisessa seriini-proteaasiosassa on noin 251 aminohappoa ja aktivaattorissa on tästä lähtökohtaan päin "kringle-alueen" sisältävä sekvenssi, jonka uskotaan olevan syynä fibriinin sitoutumiseen. Valmiissa proteiinissa ja sen signaali-esisekvenssissä on yhteensä 562 aminohappoa.

Edellä kuvatulla menetelmällä voidaan jo itsessään hyvin valmistaa puhdasta t-PA-aktivaattoria. Keksinnön mukaisilla

menetelmillä, joissa käytetään vielä yhtä metotrekssaattiherkkää koodaussekvenssiä, on mahdollista valmistaa isäntä-soluviljelmissä antigeenisesti aktiivista t-PA-proteiinia yli 0,1 pg/solu/päivä. Sopivissa sovellutus- ja vahvistusolosuhteissa voidaan saada yli 20 pg <sup>(solu/päivä)</sup> suuruisia määriä. Toisin sanoen ilmoitettuna saavutetaan geeniekspressiotaso, jotka johtavat yli  $9 \times 10^{-6}$  Plough-yksikön <sup>(solu/päivä)</sup> muodostumiseen, tai sopivalla vahvistuksella yli  $18 \times 10^{-4}$  <sup>(solu/päivä)</sup> Plough-t-PA-aktiivisuuden <sup>den</sup> ~~muodostamiseen~~ muodostamiseen.

Keksinnössä on tässä kohden edullista käyttää lääkeaineena metotrekssaattia, joka vaikkakin se tavallisesti on tappava sitä sisäänsä pystymään ottaville soluille, mahdollistaa solujen kasvamisen kontrolloitujen MTX-määrien läsnäollessa vahvistamalla geeniiä, joka koodaa DHFR-koodaavaa sekvenssiä (Schimke, Robert T. et al, Science, 202: 1051 (1978); Biedler, J.L. et al, Cancer Res. 32: 153 (1972); Chang, S.E., et al, Cell, 7: 391 (1976)).

Keksinnön tälle puolelle on tärkeää osoittaa, että DHFR-proteiinin geenin vahvistaminen voi aiheuttaa siihen liittyvien, muita proteiineja koodaavien sekvenssien vahvistumisen. Näin näyttää asianlaita olevan, kun tämä liittynyt proteiini on hepatiitti B pinta-antigeeni (HBsAG) (Christman, J. et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 1815 (1982); E.coli proteiini XGPRT (Ringold, Gordon, et al, J. Molec. and Appl. Gen., 1: 165 81981)); ja endogeeninen sekvenssi DHFR/SV40-plasmidi-yhdistelmästä (Kaufman, R.F. et al, J. Molec. Biol., 159: 601 (1982)).

Muita metotrekssaatti-resistenttiyden antavia mekanismeja ovat DHFR-proteiinin sitoutumisaffiniteetin pienentäminen, jolloin se on vähemmän herkkä metotreksaatille (Flintoff, W.F. et al, Somat. Cell Genet., 2: 245 (1976)) mutta tässä tapauksessa näyttää myös tapahtuvan vahvistumista.

Näyttää siltä, että metotreksaatin mukanaolo vahvistaa

sekä villityypin DHFR-proteiinin että sellaisen DHFR-proteiinin geenejä, joka on resistentti metotrekseatille oman pienentyneen sitoutumiskykynsä ansiosta. Keksinnön tämän puolen kohteena on siten periaatteessa se, että liittyvää proteiinia koodaaviin sekvensseihin kohdistuvaa DHFR-sekvenssin vahvistusvaikutusta käytetään kontrollimekanismina, joka mahdollistaa korkeammat t-PA-sekvenssien ekspressiotasot metotrekseatin läsnäollessa tai sen ansiosta, että ensin on käsitelty transformoidut solut metotrekseatilla.

### E. Esimerkit

Seuraavat esimerkit havainnollistavat keksintöä (sitä rajoit- pois /  
tamatta). Näissä esimerkeissä käytettiin isäntäsoluviljelmiä E.coli isäntäviljelmää ja CHO-solulinjaa, jolla voidaan tuoda DHFR-proteiinia koodaava sekvenssityyppi. Keksinnön mukaisessa menetelmässä voidaan kuitenkin käyttää myös muita eukaryoottisia ja prokaryoottisia soluja.

#### E.1 Ihmisen t-PA-geenin ekspressoituminen E. colissa

##### E.1.A Kuvien selitykset

Kuvio 1 on autoradiogrammi 10-prosenttisesta SDS <sup>35</sup>Sivusta akryyliamidi-  
~~geelistä~~ josta näkyy immunosaostettu /<sup>35</sup>S/-metioniinilla  
leimattu proteiini (proteiinit), joka on erittynyt ihmisen melanoomasoluista 3 tunnin pulssin aikana in vivo, kun mukana on (rata b) tai ei ole (rata a) proteaasin inhibiittorina toimivaa aprotiniinia. Sen jälkeen kun kudoksen plasminogeenin aktivaattorille spesifisellä IgG:llä oli suoritettu immunosaostus, havaittiin kolme vyöhykettä (rata a), joiden molekyylipainot olivat noin 65.000, 63.000 ja 35.000. Proteaasin inhibiitin läsnäollessa ei kuitenkaan havaita lainkaan vyöhykettä, jonka molekyylipaino on 35.000. Kun käytetään esi-immuuniseerumia (rata c), ei immunosaostu lainkaan tuotteita. <sup>14</sup>C-leimattujen proteiinistandardien kulkeutumisesta ja molekyylipainot on esitetty radan a vasemmalla

puolen.

Kuvio 2 kuvaa happo-urea-agarosigeelistä eristettyjen RNA-jakeiden immunosaostettujen translaatiotuotteiden <sup>geeli-</sup>elektroforeesia. Jakeissa numerot 7 ja 8 havaittiin suurin vyöhyke sen jälkeen, kun oli suoritettu translaatio koiran haiman mikrosomien läsnäollessa ja tämän jälkeen immunosaostettu kudoksen plasminogeenin aktivaattorille spesifisellä IgG:llä. Tämän vyöhykkeen molekyylipaino on suurin piirtein 63.000 daltonia. Jakeissa 7 ja 8 kulkeutuvan mRNA:n koko on noin 21 - 24S. Kyseisten geeliratojen yläpuolelle on merkitty ribosomaalisten RNA-markereiden sijainnit, jotka määritettiin RNA-ureageelillä suoritettun elektroforeesin jälkeen ja tehtiin näkyväksi etidiumbromidi-värjäyksellä.

Kuviossa 3 on esitetty 96 pesäkkeen hybridisaatiokuvio  $^{32}\text{P}$ -dT(C<sub>G</sub>)CA(C<sub>G</sub>)TA(C<sub>T</sub>)TCCCA (W-E-Y-C-D)-koettimeella. 96 erillistä transformanttia kasvatettiin mikrotiitterilevyllä, maljattiin replikat ja kasvatettiin nitroselluloosakalvolla. Tämän jälkeen pesäkkeet lyysattiin, kiinnitettiin bakteeriperäinen DNA ja suodattimet hybridisoitiin  $^{32}\text{p}$ -14-mer (W-E-Y-C-D)-koettimeilla. Suodattimista poistettiin hybridisoitumaton koetin pesemällä ja suodattimet valotettiin röntgensädefilmillä. Tämä autoradiogrammi on tyypillinen kuvio, joka saatiin 48 yksittäisellä suodattimella (4600 erillistä pesäkettä). Suodattimella numero 25 on merkitty nuolella E10-kloonin, joka on esimerkki positiivisesta kudoksen plasminogeenin aktivaattori-cDNA-kloonista.

Kuvio 4 on täyspitkän ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattori-cDNA:n restriktioendonukleasikartta. Fragmenttien, jotka oli muodostettu lohkaisemalla restriktioendonukleasilla, lukumäärä ja koko arvioitiin elektroforeesin avulla 6-prosenttisilla akryyliamidigeeleillä. Kohtien sijainnit vahvistettiin nukleiinihapposekvenssin avulla (esitetty kuviossa 5). Suurimman avoimen lukukehikon koodausalue on suljettu viivoin, ja viivoin varjostettu alue tarkoittaa oletettua signaali-

peptidisekvenssiä. Pistein varjostettu alue tarkoittaa oletettua valmista kudoksen plasminogeenin aktivaattorisekvenssiä (527 aminohappoa). mRNA:n 5'-pää on vasemmalla ja 3'-pää oikealla.

Kuvioissa 5A, 5B ja 5C on esitetty täyspitkän ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattori-cDNA:n nukleotidisekvenssi ja johdettu aminohapposekvenssi. Valmista sekvenssiä edeltävät 35 aminohappoa (-35 - -1) on kuvattu sekvenssinä, jossa ei ole välejä. Tämän 35-aminohappoisen sekvenssin uskotaan muodostuvan hydrofiilisestä "esisekvenssistä", joka edeltää noin 12 - 15 aminohapon pituisen valmiin proteiinin seriiniä (+1) ja jonka edellä vuorostaan on "tavanomainen" hydrofobinen signaali (väli 5' - -35). Erittyneiden proteiinien tämän tyyppinen pre-pro-rakenne on kuvattu aikaisemmin, esimerkiksi preproalbumiinin yhteydessä. Tämän teorian perusteella kaikki erittyneet kudospasminogeenin aktivaattorimolekyylit alkavat seriinillä (+1) amino-päänä. Toinen teoria on, että hydrofiilinen sekvenssi saattaa liittyä kudoksen plasminogeenin aktivaattorin toimintaan samalla tavoin kuin mitä on havaittu plasminogeenillä, jossa 10.000 daltonin peptidi voidaan lohkaista natiivin plasminogeenin amino-terminaali-osasta (amino-terminaaliryhmän perusteella nimetty Glu-plasminogeeniksi). Näin muodostuu pienempi molekyyli, jossa on uusi amino-pää ja josta käytetään merkintää Lys-plasminogeeni. Lys-plasminogeeni aktivoituu helpommin plasmiinin suhteen ja sillä on myös suurempi affiniteetti fibriinin suhteen kuin Glu-plasminogeenillä. Plasmiinin on osoitettu katalysoivan Glu-plasminogeenin muuntumisen Lys-plasminogeeniksi. Tämän tyyppinen kontrollimekanismi johtaa "positiiviseen feedback"-mekanismiin. Ensimmäiset muodostuneet plasmiinimäärät, jotka hajottavat fibriiniä, aiheuttavat myös sen lisäksi plasminogeenimolekyylien muodostumista, jotka natiiviin plasminogeeniin verrattuna aktivoituvat helpommin ja myös sitoutuvat tiukemmin substraattiinsa. Tämän seurauksena fibriini hajoaa nopeammin. Kudoksen plasminogeenin aktivaattorin hydrofiilinen peptidi saattaa liittyä samanlaiseen mekanismiin, jolloin sen lohkaaminen johtaa muuttuneeseen

entsyymin sitoutumiseen fibriiniin. 35 aminohapon sekvenssiä pidetään joka tapauksessa valmiin proteiinin esisekvenssinä.

Kuvio 6 on kaaviollinen diagrammi kudospasminogeenin aktivaattorin p $\Delta$ RIPA<sup>0</sup>-ekspressioplasmidin rakenteesta. Lähtöplasmidista pPA25E10 eristettiin ensin PstI-käsittelyllä 376 bp fragmentti, joka sen jälkeen digestoitiin kuviossa esitetyllä tavalla.

Kuviossa 7 on esitetty tulos fibriinimalja-analyysistä, jolla määritettiin p $\Delta$ RIPA<sup>0</sup>-plasmidin kautta saadun ekspressiotuotteen fibrinolyyttinen aktiivisuus transformoiduissa soluissa.

Kuviossa 8 on esitetty HPLC-grammi peptideistä, jotka on saatu digestoimalla trypsiinillä kudospasminogeenin aktivaattori (Absorbanssi 210 nm). Nuolella on osoitettu sitä peptidiä vastaava piikki, jota käytettiin pesäkekirjaston yhteydessä käytetyn nukleotidi-koettimen tekoon. Tämän piikin esittämällä peptidillä havaittiin olevan seuraava täysi sekvenssi: L-I-W-E-Y-C-D-V-P-S-C-S-I-C-G-L. Myös muut isommat piikit sekvensoitiin samalla tavoin ja havaittiin vahvistavan ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattorin oikean aminosekvenssin. Seuraavassa on annettu aminohappoja vastaava yksikirjaiminen peptidikoodi:

|     |   |                  |     |   |                |
|-----|---|------------------|-----|---|----------------|
| Asp | D | Asparagiinihappo | Ile | I | Isoleusiini    |
| Thr | T | Treoniini        | Leu | L | Leusiini       |
| Ser | S | Seriini          | Tyr | Y | Tyrosiini      |
| Glu | E | Glutamiinihappo  | Phe | F | Fenyyialaniini |
| Pro | P | Proliini         | His | H | Histidiini     |
| Gly | G | Glysiini         | Lys | K | Lysiini        |
| Ala | A | Alaniini         | Arg | R | Arginiini      |
| Cys | C | Kysteiini        | Trp | W | Tryptofaani    |
| Val | V | Valiini          | Gln | Q | Glutamiini     |
| Met | M | Metioniini       | Asn | N | Asparagiini    |

Kuviossa 9 on kuvattu palsmidin, joka koodaa valmiin ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattorin suoraa ekspressiota E.coli-bakteerissa, rakenne. 50 µg plasmidia pPA17 digestoitiin Sau3AI, HincII ja HhaI entsyymeillä ja elektroforesoitiin 6-prosenttisella polyakryyliamidigeelillä. Talteen saatiin noin 0,5 µg 55 bp Sau3AI-HhaI-fragmenttia. Samalla tavoin puhdistettiin noin 3 µg 263 bp HhaI-NarI-fragmenttia 80 µg:sta kloonista pPA25E10 eristämällä ensin 300 bp PstI-NarI-fragmentti ja sen jälkeen digestoimalla tämä fragmentti HhaI:llä. Kaikki digestiot suoritettiin 1 tunnin aikana 37°C:ssa ja reaktiotuotteet erotettiin ja eluoitiin sähköisesti 6-prosenttisista polyakryyliamidigeelistä. Molemmat osoitetut deoksioligonukleotidit 5' dAATTCATGTCCTTATCAAGT (I) ja 5' GATCACTTGATAAGACATG (II) syntetisoitiin kiinteäfaasisella fosfotriesterimenetelmällä (51). 100 pikomoolia oligonukleotidia II fosforyloitiin 30 µl:ssa reaktioseosta, joka sisälsi 60 mM Tris-puskuria (pH 8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM β-merkaptetanolia ja 50 µCi /λ<sup>32</sup>P/ATP (Amersham 5.000 Ci mmol<sup>-1</sup>), lisättiin 12 yksikköä T4 polynukleotidikinaasia ja reaktion annettiin jatkua 15 minuuttia 37°C:ssa. Tämän jälkeen lisättiin 1 µl 10 mM ATP ja 12 yksikköä T4-kinaasia ja reaktion annettiin jatkua vielä 30 minuuttia. Fenoli/CHCl<sub>3</sub>-uuton jälkeen yhdistettiin keskenään fosforyloitu oligomeeri II ja 5' hydroksyylioligomeeri I sekä 0,5 µg eluoitua 55 bp Sau3AI-HhaI-fragmenttia ja 2 µg 263 bp HhaI-NarI-fragmenttia ja saostettiin etanolilla. Nämä fragmentit ligatoitiin huoneen lämpötilassa 4 tunnin aikana 60 µl:ssa seosta, joka sisälsi 20 mM Tris-HCl-puskuria (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ditiotreitolia, 0,5 mM ATP ja 1000 yksikköä T4 DNA-ligaasia. Seosta digestoitiin 1 tunti seoksella, joka sisälsi 48 yksikköä NarI-, 20 yksikköä EcoRI- ja 40 yksikköä BglII-entsyymiä (jotta estettäisiin polymeroituminen, joka johtuu koheesiivisten Sau3AI-päiden ligatoitumisesta), ja elektroforesoitiin 6-prosenttisella geelillä. 338 bp tuote (noin 0,1 µg) otettiin talteen eluoimalla sähköisesti. Loput t-PA-koodaavista sekvensseistä (aminohapot 111-528) eristettiin 1645 bp-fragmentilla digestoimalla plasmidi pPA25E10 NarI ja BglII entsyymeillä. Plasmidi

pLeIFAttrp103 on johdos plasmidista pLeIFA25 (52), josta on poistettu LeIF A geenin suhteen distaalisti sijaitseva EcoRI (53). 3 µg pLeIFAttrp103-plasmidia digestoitiin 20 yksiköllä EcoRI-entsyymiä ja 20 yksiköllä BglII-entsyymiä 90 minuuttia 37°C:ssa, elektroforesoitettiin 6-prosenttisella polyakryyliamidigeelillä ja suuri (noin 4.200 bp) vektori-fragmentti otettiin talteen elektroeluoimalla. Rakenne viimeisteltiin ligatoimalla 80 ng EcoRI-BglII pLeIFAttrp103:a ja 100 ng 1645 bp NarI-BglII-fragmenttia ja 20 ng 338 bp EcoRI-NarI-fragmenttia 10 tuntia huoneen lämpötilassa. Tällä ligatointiseoksella transformoitiin E.coli K-12 kanta 294. 38 tällaisesta transformantista valmistettiin plasmidi-DNA ja digestoitiin EcoRI-entsyymillä. Kymmenen näistä plasmideista sisälsi haluttuja 600 bp ja 472 bp EcoRI-fragmentteja. DNA-sekvenssianalyysi vahvisti, että yhdellä näistä plasmideista (pt-PAtrp12) oli haluttu nukleotidisekvenssi trp-promoottorin, synteettisen DNA:n ja cDNA:n välisissä liitoskohdissa.

Kuviossa 10 on esitetty tulos fibriinimalja-analyysistä, jolloin määritettiin kudospasminogeenin aktivaattorin ekspressiotuotteen fibrinolyttinen aktiivisuus. Yhden yön ikäinen E.coli W3110/pt-PAtrp12-viljelmä Luria-liemessä, joka sisälsi 5 µg/ml tetrasykliiniä, laimennettiin 1:100 M9-mediumiin, joka sisälsi 0,2 % glukosia, 0,5 % kasamino-happoja ja 5 µg/ml tetrasykliiniä. Solut kasvatettiin 37°C:ssa A<sub>550</sub>-tiheyteen 0,2 ja lisättiin niin paljon indoli-akryyli-happoa, että loppukonsentraatio oli 20 µg/ml. Näytteet otettiin talteen sentrifugoimalla tiheydessä A<sub>550</sub> = 0,5-0,6 (noin 2x10<sup>8</sup> solua/ml) ja pakastettiin välittömästi. Solupelletit suspendoitiin 6M guanidiinihydrokloridiin tiheydellä 5x10<sup>8</sup> solua/ml, äänikäsiteltiin 10 sekuntia, inkuboitiin 30 minuuttia 24°C:ssa ja sen jälkeen dialysoitiin 4 tuntia liuosta vasten, jonka koostumus oli 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 250 mM NaCl, 0,25 mM EDTA ja 0,01 % Tween 80. Dialyysin jälkeen näytteet sentrifugoitiin 2 minuuttia 13.000 xg ja supernatanteista analysoitiin kudospasminogeenin aktivaattori-aktiivisuus. Noudattamalla Granelli-Piperno'n ja Reich'in (87) menetelmää

inkuboitiin maljaa 3,5 tuntia 37°C:ssa ja mitattiin lyysivyöhykkeet. Kvantitatiivinen määrittäminen tapahtui vertaamalla liuoksen, joka sisälsi puhdistettua melanoomakudoksen plasminogeenin aktivaattoria, laimennuksiin.

#### E.1.B Kudosplasminogeenin aktivaattori-mRNA:n saanti

Käytettiin ihmisen melanoomasoluja (Bowes). Melanoomasolut kasvatettiin massamaisiksi monokerroksiksi 100 ml:ssa minimialustaa (Earles Minimal Essential Media), jota oli täydennetty natriumbikarbonaatilla (loppukonsentraatio 0,12 %), 2 mM glutamiinilla ja 10 %:lla lämmöllä inaktivoitua vasikansikiöseerumia. Sen vahvistamiseksi, että melanoomasolut tuottivat aktiivisesti ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattoria, viljeltiin ihmisen melanoomasoluja massaksi 24-kaivoisessa mikrotiitterimaljassa. Solut, kun mukana oli 0,33  $\mu$ M aprotiini-proteaaasi-inhibiittia tai ilman sitä, pestiin kerran fosfaatilla puskuroidulla suolaliuoksella ja lisättiin 0,3 ml seerumia ja metioniinia sisältämätöntä mediumia. Lisättiin 75  $\mu$ Ci /<sup>35</sup>S/-metioniinia ja solut leimattiin 37°C:ssa 3 tunnin aikana. Tämän 3 tunnin pituisen leikkausjakson lopussa poistettiin soluista mediumit ja käsiteltiin joko kudosplasminogeenin aktivaattorille spesifisellä IgG:llä tai esiimmuuniseerumilla immunosaostusta varten (54). Immunosaostetut tuotteet ajettiin elektroforeesilla 10-prosenttisella SDS-akryyliamidigeelillä. Tahmea geeli kiinnitettiin, kuivattiin ja fluorografoitiin.

#### E.1.C Lähetti-RNA:n eristäminen ja fraktionointi koon perusteella

Kokonais-RNA uutettiin melanoomasoluviljelmistä oleellisesti Ward'in et al kuvaamalla tavalla (55). Solut pellettoitiin sentrifugoimalla ja suspendoitiin uudelleen sen jälkeen seokseen, jonka koostumus oli 10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ja 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Solut lyysattiin lisäämällä NP-40 (1-prosenttinen loppukonsentraatio) ja tumat pellettoitiin sentrifugoimalla. Supernatantti sisälsi kokonais-RNA:n,

joka puhdistettiin edelleen uuttamalla useaan kertaan fenolilla ja kloroformilla. Vesifaasi tehtiin 0,2-mooliseksi natriumkloridin suhteen ja sen jälkeen kokonais-RNA saostettiin lisäämällä 2 tilavuusosaa etanolia. mRNA puhdistettiin kokonais-RNA-valmisteista käyttämällä oligo-dT-selluloosakromatografiaa (55). 10 g eristä viljeltyjä melanoomasoluja saatiin tyypillisinä saantoina 5 - 10 mg kokonais-RNA ja 50 - 200 µg Poly(A) plus mRNA.

PolyA<sup>+</sup> mRNA (200 µg) fraktioitiin (56) elektroforeesin avulla urea-agarosigeelin läpi. Tahmea agarosigeeli (57, 58) sisälsi 1,75 % agarosia, 0,025 M natriumsitraattia, pH 3,8 ja 6 M ureaa. Elektroforeesi suoritettiin 7 tunnin aikana 25 milliamperin voimakkuudella ja 4°C:ssa. Tämän jälkeen geeli fraktioitiin parranajokoneen terän avulla. Yksittäiset viipaleet sulatettiin 70°C:ssa ja uutettiin kaksi kertaa fenolilla ja kerran kloroformilla. Tämän jälkeen jakeet saostettiin etanolilla ja tämän jälkeen analysoitiin in vitro translaatoimalla kaniinin retikulosyytti-lysaattisysteemissä, Bethesda Research Lab. (59,60), jota oli täydennetty koiran haiman mikrosomeilla: Translaatiot suoritettiin käyttämällä 25 µCi /<sup>35</sup>S/-metioniinia ja 500 nanogrammaa kunkin geeliviipaleen RNA 30 µl:n lopputilavuudessa, joka sisälsi 25 mM HEPES'ta, 48,3 mM kaliumkloridia, 10 mM kreatiinifosfaattia, 19 aminohappoa kutakin 50 mM:n konsentraatiossa, 1,1 mM magnesiumkloridia, 16,6 mM EDTA, 0,16 mM ditiotreitolia, 8,3 mM hemiiniä, 16,6 µg/ml kreatiinikinaasia, 0,33 mM kalsiumkloridia, 0,66 mM EGTA ja 23,3 mM natriumkloridia.

Inkuboinnit suoritettiin 30°C:ssa 90 minuuttia. Koiran haiman mikrosomaaliset membraanit, jotka oli valmistettu puhdistamattomista mikrosomeista käyttämällä ribosomien poistamiseen EDTA (61), käsiteltiin nukleaasilla viitteessä (62) kuvatulla tavalla. Niitä oli mukana translaatioseoksessa 7 A<sub>260</sub> yksikkö/ml loppukonsentraatiossa. Translaatiotuotteet eli immunosaostetut translaatiotuotteet analysoitiin elektroforesoimalla 10-prosenttisella polyakryyliamidigeeleillä natriumdodekyylisul-

faatissa aikaisemmin kuvatulla tavalla (63). Värjäämättömät tahmeat geelit kiinnitettiin, kuivattiin ja fluorografoitiin (64).

Jokaisesta geelijakeesta saadut translaatiotuotteet immuno-saostettiin kaniinin ihmiskudoksen vastaisen plasminogeenin aktivaattorille spesifisellä IgG:llä. Yksi suuri immunosaostettu polypeptidivyöhyke havaittiin RNA-jakeiden 7 ja 8 translaatiossa (kulkeutuminen 21 - 24S), jonka molekyylipaino on noin 63.000 daltonia. Tätä vyöhykettä ei havaittu, kun immunosaostukseen käytettiin esi-immuuni-IgG, mikä viittaa siihen, että nämä polypeptidit olivat spesifisiä kudoksen plasminogeenin aktivaattorille.

#### E.1.D Kudospasminogeenin aktivaattorisekvenssit sisältävän pesäkekirjaston valmistaminen

Kaksisäikeisen cDNA:n valmistamiseen vakiomenetelmillä (52, 65, 66) käytettiin viisi µg geelifraktioitua mRNA (geeliviipale 7mRNA). cDNA fraktioitiin koon perusteella 6-prosenttisella polyakryyliamidigeelillä. Yli 350 emäsparin pituinen cDNA (125 ng) elektroeluoitiin. 30 ng cDNA jatkettiin deoksi(C)-ryhmillä käyttämällä terminaalista deoksinukleotidyylitransferaasia (67) ja liitettiin 300 ng kanssa plasmidia pBR322 (68), johon samalla tavoin oli liitetty deoksi(G)-ryhmiä kohdassa Pst I (67). Sen jälkeen yhdistetty seos transformoitiin E.coli K12 kantaan 294 (ATCC n:o 31446). Saatiin noin 4.600 transformanttia.

#### E.1.E DNA-koettimen valmistaminen

Viitteissä (19, 20) esitetyllä menetelmällä saatiin puhdistettua ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattoria.

Synteettisten koettimien valmistamiseen parhaiten sopivien alueiden löytämiseksi molekyyli skannattiin seuraavasti:

Trypsiinihajotukselle alttiiden proteiinien tekemiseksi se pelkistettiin ja karboksimeetyloitiin. Ensin dialysoitiin yön aikana huoneen lämpötilassa 2 mg näyte kudospasminogeenin aktivaattoria, kun vasta-aineena oli 0,01-prosenttinen Tween 80. Tämän jälkeen lyofilisoitu proteiini liuotettiin 12 ml:aan seosta, joka sisälsi 0,56 M Tris-HCl puskuria (pH 8,6), 8 moolia ureaa ja 5mM EDTA. Disulfididisidokset pelkistettiin lisäämällä 0,1 ml  $\beta$ -merkaptotoetanolia. Tämä reaktio suoritettiin typen alla 2 tunnin aikana 45°C:ssa. Pelkistetyt disulfidit alkyloitiin karboksimeetyylijohtokseksi lisäämällä 1,0 ml 1,4 M jodietikkahappoa 1N natriumhydroksidissa. Reaktion jatkuttua 20 minuuttia huoneen lämpötilassa se pysäytettiin dialysoimalla 18 tuntia huoneen lämpötilassa 0,01-prosenttista Tween 80 vasta-ainetta vasten ja lyofilisoitiin.

Saatu lyofilisoitu karboksimeetyloitu proteiini liuotettiin uudelleen 3 ml:aan 0,1 M natriumfosfaattipuskuria (pH 7,5). Lisättiin trypsiiniä (TPCK) (1:50) ja digestoitiin 37°C:ssa. 3, 6 ja 12 tunnin kuluttua otettiin tasaosat (0,1 ml). Trypsiiniä lisättiin toisen kerran 12 tunnin kuluttua. 24 tunnin kuluttua reaktio pysäytettiin pakastamalla näytettä, kunnes se voitiin injisoida HPLC-laitteeseen. Digestion kulku määritettiin ajamalla tasaosista SDS-geelit. Kaikki geelit olivat puhtaita lukuunottamatta heikkoa vyöhykettä 3 tunnin tasaosassa. Tämä osoitti, että digestio oli tapahtunut 24 tunnissa kokonaan ja että jäljelle ei jäänyt mitään suuria peptidejä.

Suuren erotuskyvyn Altex-kolonnein (C-8 ultrasphere 5 u) injisoitiin näyte (noin 0,5 ml) kahtena ajona. Käytettiin asteettaista asetonitriiligradianttia (1 % - 5 % 5 minuuttia, 5 % - 35 % 100 minuuttia, 35 - 50 % 30 minuuttia). Toisessa näistä kahdesta preparatiivisesta ajosta seurattiin eluanttia kahdella aallonpituudella (210 nm ja 280 nm). Näiden kahden aallonpituuden absorptioiden suhdetta käytettiin tryptofaasia sisältävien peptidien osoittamiseen.

Ensin sekvensoitiin ne peptidipiikit, jotka todennäköisimmin sisälsivät tryptofaania, tai joiden uskottiin olevan muista syistä hyödyllisiä. Tämä mahdollisti sekvenssin määrittämisen useimpien tryptofaanien läheisyydessä. Sen jälkeen kun noin 25 parasta mahdollista peptidipiikkiä oli sekvensoitu, sekvenssitiedot, jotka olivat yhteensovitettavissa, kudospasminogeenin aktivaattorin primäärirakenteen alustavaksi malliksi. Näistä tiedoista ja tästä mallista löydettiin useita mahdollisia koettimia.

#### E.1.F Kudospasminogeenin aktivaattori-cDNA-sekvenssejä sisältävien bakteeripesäkkeiden tunnistaminen

Pesäkkeet siirrostettiin yksitellen mikrotiitterilevyjen kaivoihin, jotka sisälsivät LB (93) ja 5 µg/ml tetrasykliiniä, ja säilytettiin -20°C:ssa sen jälkeen, kun oli lisätty dimetyylisulfoksidia 7 % asti. Pesäkekirjastosta kasvatettiin kaksi kopiota nitroselluloosasuodattimilla ja kunkin pesäkkeen DNA kiinnitettiin suodattimeen Grunstein-Hogness'in menetelmällä (69).

Edellä kuvatulla tavalla valmistettiin <sup>32</sup>P-leimattu - TC(<sup>A</sup><sub>G</sub>)CA(<sup>A</sup><sub>G</sub>)TA(<sup>C</sup><sub>T</sub>)TCCCA-koetin (synteettisestä oligomeeristä), (W-E-Y-C-D) 14-mer pooli. Suodattimet, jotka sisälsivät 4.600 transformanttia, esihybridisoitiin 2 tunnin ajan huoneen lämpötilassa seoksessa, jonka koostumus oli: 50 mm natriumfosfaatti pH 6,8, 5X SSC (80), 150 µg/ml äänikäsitelty lohensiittiön DNA, 5X Denhardt'in liuos (85) ja 10 % formamidi, ja sen jälkeen hybridisoitiin niin, että samassa liuoksessa oli leimattua koetinta 50X 10<sup>6</sup> pulssia per minuutti. Inkuboitiin yön yli huoneen lämpötilassa ja sen jälkeen suodattimet pestiin kolme kertaa huoneen lämpötilassa 30 minuuttia seoksella, joka sisälsi 6X SSC ja 0,1 % SDS, ja kerran 2X SSC:ssä ja sen jälkeen valotettiin Kodak XR-5-röntgensädekalvolla 16 tunnin ajan käyttämällä vahvistusvarjostimia (Dupont Lightning Plus).

Plasmidi-DNA eristettiin pikamenetelmällä (71) kaikista pesäkkeistä, joilla oli positiivinen hybridisointireaktio. Tämän jälkeen sekvensoitiin näistä kloonista saadut cDNA-insertit, kun ensin oli subkloonattu fragmentit M13 vektoriin mp 7 (73), Maxam Gilbert'in kemiallisella menetelmällä (74). Kuviossa 3 on esitetty suodatin numero 25, jossa näkyy positiivisen kudosplasminogeenin aktivaattorikloonin hybridisaatiokuvio. cDNA-insertin kloonissa 25E10 osoitettiin DNA-koodaavan kudosplasminogeenin aktivaattoria vertaamalla sen aminohapposekvenssiä peptidisekvenssiin (kts. supra), joka oli saatu puhdistetusta kudosplasminogeenin aktivaattorista, ja sen E.coli-bakteerissa muodostetun ekspressiotuotteen avulla, kuten on kuvattu yksityiskohtaisemmin infra. Kloonin (plasmidin pPA25E10 cDNA-insertin) 25E10 pituus oli 2304 emäsparia ja sen pisin avoin lukukehys koodasi 508 aminohapon proteiinia (molekyylipaino 56,756) ja sisälsi 772 bp 3' transloitumattoman alueen. Tällä cDNA-kloonilla ei ollut N-terminaalisia koodaussekvenssejä.

#### E.1.G Ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattorikloonin suora ekspressoituminen E.coli-bakteerissa

Seuraavassa viitataan kuvioon 6. 50 ug pPA25E10 (supra) digestoitiin Pst I-entsyymillä ja 376 bp fragmentti eristettiin elektroforesoimalla 6-prosenttisella polyakryyliamidigeelillä. Geelistä eristettiin elektroeluoimalla noin 3 µg tätä fragmenttia, digestoitiin 30 yksikön kanssa Dde I entsyymiä 1 tunti 37°C:ssa, uutettiin fenolilla ja kloroformilla ja saostettiin etanolilla. Saadut Dde I liitospäät jatkettiin tasapäiksi lisäämällä reaktioseokseen 5 yksikköä DNA polymeraasia I (Klenow-fragmentti) ja 0,1 mM dATP, dCTP, dGTP ja dTTP ja inkuboimalla 8 tuntia 4°C:ssa. Fenoli- ja kloroformiuuton jälkeen DNA digestoitiin 2 tuntia 15 yksiköllä Nar I entsyymiä ja reaktioseos elektroforesoitiin 6-prosenttisellä polyakryyliamidigeelillä. Haluttua tasapäistä 125 bp Nar I fragmenttia saatiin talteen noin 0,5 µg. Tämä fragmentti koodaa valmiin, täysipituaisen kudosplasminogeenin aktivaattoriproteiinin aminohappoja 69 - 110.

1645 bp Nar I - Bgl II fragmentin eristämiseksi digestoitiin 30 ug pPA25E10 plasmidia 30 yksiköllä Nar I ja 35 yksiköllä Bgl II entsyymiä 2 tunnin ajan 37°C:ssa ja reaktioseos elektroforesoitui 6-prosenttisella polyakryyliamidigeelillä. Haluttua 1645 bp Nar I - Bgl II fragmenttia saatiin talteen noin 6 ug.

pdeltaR1SRC-plasmidi on pSRCex16-plasmidin (79) johdos, jossa trp-promoottorin suhteen proksimaalisesti ja SRC-geenin suhteen distaalisesti sijaitsevat Eco RI kohdat on poistettu DNA polymeraasi I käsittelyllä (28) ja itse-komplementtinen oligodeoksinukleotidi AATTATGAATTCAT (syntetisoitu fosfortriesterimenetelmällä (75)) oli insertoitu jäljelle jääneeseen Eco RI kohtaan, joka sijaitsee välittömästi Xba I kohdan vieressä. 20 ug pdeltaR1SRC-plasmidia digestoitiin täysin Eco RI entsyymillä, uutettiin fenolilla ja kloroformilla ja saostettiin etanolilla. Sen jälkeen plasmidi digestoitiin 100 yksikön kanssa nukleaasi S1 entsyymiä 16°C:ssa 30 minuutin aikana seoksessa, joka sisälsi 25 mM natriumasetaattia (pH 4,6), 1 mM ZnCl<sub>2</sub> ja 0,3 moolia natriumkloridia, jolloin saatiin ATG-sekvenssinen tasapää. Fenoli- ja kloroformiuuton ja etanolisaostuksen jälkeen DNA digestoitiin Bam HI entsyymillä, elektroforesoitui 6-prosenttisella polyakryyliamidigeelillä ja elektroeluoimalla otettiin talteen (4.300 bp) vektorifragmentti.

Ekspressioplasmidi koottiin ligatoimalla yhteen 0,2 ug vektoria, 0,06 ug tasapäistä 125 bp - Nar I fragmenttia ja 0,6 ug 1645 bp Nar I - Bgl II fragmenttia 10 yksiköllä T<sub>4</sub> DNA-ligaasia 7 tunnin aikana huoneen lämpötilassa ja plasmidilla transformoitiin E.coli kanta 294 (ATCC n:o 31446) ampisilliiniresistantiksi. Plasmidi-DNA valmistettiin 26 pesäkkeestä ja digestoitiin Xba I ja Eco RI entsyymeillä. Näistä plasmideista sisälsi 12 plasmidia haluttuja 415 bp Xba I - Eco RI ja 472 bp Eco RI-fragmentteja. DNA-sekvenssianalyysi vahvisti, että useissa näistä plasmideista ATG-aloituskodoni sijaitsi oikein mainohapon numero 69 (seriini)

alussa. Eräs näistä plasmideista, p $\Delta$ RIPA<sup>0</sup>, testattiin ja se muodosti haluttua kudospasminogeenin aktivaattoria (kuvio 7).

#### E.1.H Täyspitkä kudospasminogeenin aktivaattori-cDNA

- a) N-terminaalisia kudospasminogeenin aktivaattorisekvenssejä sisältävän pesäkekirjaston valmistaminen

Kaksisäikeinen cDNA valmistettiin vakiomenetelmillä (65, 66) priimaamalla 7,5 ug geelifraktion numero 8 mRNA (supra) 0,4 ug:lla synteettistä 5' TTCTGAGCACAGGGCG 3' oligonukleotidia. cDNA fraktioitiin koon perusteella 6-prosenttisella polyakryyliamidigeelillä. Jae (36 ng), jonka koko oli suurempi kuin 300 emäsparia, elektroeluoitiin. 5 ng cDNA jatkettiin deoksi(C)-ryhmillä käyttämällä terminaalista deoksisytidyylitransferaasia (67) ja liitettiin 50 ng kanssa pBR322-plasmidia (68), jota oli samalla tavoin jatkettu deoksi(G)-ryhmillä kohdassa Pst I (67). Liitetty seos transformoitiin tämän jälkeen E.coli K12 kannaksi 294. Saatiin noin 1.500 transformanttia.

- b) Ihmisen genomi-DNA:n hybridisointi Southern-menetelmällä

Koska cDNA-priimausreaktio oli suoritettu käyttämällä synteettistä fragmenttia, joka hybridisoi 13 emäsparia pPA25E10-kloonin N-terminaalista, cDNA-kloonien seulomiseen tässä 29 emäsparin alueella (joka sisältää 16-mer sekvenssin) ei ollut saatavissa mitään sopivaa restriktiofragmenttia. Sen vuoksi oli välttämätöntä eristää ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattorin genomikloonit, jotta voitaisiin tunnistaa mahdolliset primeerijatketut cDNA-kloonit, jotka sisältävät N-terminaalisia kudospasminogeeniaktivaattorin koodaussekvenssejä.

Tämän menetelmän ensimmäisessä vaiheessa vahvistetaan se, että ihmisen genomi-DNA:ssa on mukana vain yksi ainoa homo-

loginen kudostasminogeenin aktivaattorigeeni. Tämän määrittämiseksi suoritettiin Southern-hybridisointi. Tässä menetelmässä (77), erilaisilla restriktioendonukleaaseilla digestoitettiin täydellisesti 5 ug suurimolekyyllipainoista ihmisen lymfosyytti-DNA (valmistettu kuten viitekohdassa 80), elektroforesoitiin 1,0-prosenttisilla agarosigeeleillä (81) ja kuivattiin nitroselluloosafiltterille (77). ~~cDNA-kloonin~~ pPA25E10 cDNA-insertin 5'päästä (230 bp Hpa II - Rsa I fragmentti) valmistettiin (76) <sup>32</sup>P-leimattu DNA-koetin ja hybridisoitiin (82) nitroselluloosafiltterin kanssa. Koetinta hybridisoitiin 40 tuntia  $35 \times 10^6$  pulssia minuutissa ja sen jälkeen pestiin kuvatulla tavalla (82). Kaksi endonukleaasi-sulatuskuviota tuottaa vain yhden ainoan hybridisoivan DNA-fragmentin: Bgl II (5,7 Kbp) ja Pvu II (4,2 Kbp). Hinc II kanssa havaittiin vain kaksi hybridisoituvaa DNA-fragmenttia (5,1 Kbp ja 4,3 Kbp). Yhdessä nämä tiedot viittaavat siihen, että ihmisen genomissa on mukana vain yksi ainoa kudostasminogeenin aktivaattorigeeni ja että tämä geeni sisältää ainakin yhden välisekvenssin.

c) Ihmisen  $\lambda$ -faagikirjaston seulonta kudostasminogeenin aktivaattorigeenien suhteen

Kudostasminogeenin aktivaattorigeenejä sisältävien  $\lambda$ -faagirekombinanttien tunnistamiseen käytettyä strategiaa muodostui siitä, että nukleotidihomologi etsitään radioaktiivisella koettimella, joka on valmistettu kudostasminogeenin aktivaattorigeenin ~~cDNA:sta~~ <sup>pPA25E10</sup> kloonista. Yksi miljoona rekombinantti- $\lambda$ -faageja maljattiin DP 50 Sup F:lle tiheydellä 10.000 pfu/15 cm malja ja kustakin maljasta valmistettiin nitroselluloosa-suodatin-replikat Benton'in ja Davis'in menetelmällä (78). Vakiomenetelmällä (83) valmistettiin <sup>32</sup>P-leimattu DNA-koetin 230 emäsparin Hpa II - Rsa I fragmentissa, joka sijaitsi 34 emäsparin päässä <sup>pPA</sup> ~~p25E10-kloonin~~ <sup>plasmidin</sup> 5'-päästä. Jokainen nitroselluloosasuodatin esihybridisoitiin 42°C:ssa 2 tunnin aikana seoksessa, joka sisälsi 50 mM natriumfosfaattia (pH 6.5), 5X SSC (77), 0,05 mg/ml äänikäsiteltyä lohen

siittiö-DNA, 5X Denhardt'in liuosta (84) ja 50 % formamidia, ja sen jälkeen hybridisoitiin leimatun koettimen kanssa ( $50 \times 10^6$  pulssia minuutissa samassa liuoksessa, joka sisälsi 10 % natriumdekstraanisulfaattia (85)). Inkuboitiin yön yli  $42^\circ\text{C}$ :ssa ja sen jälkeen suodattimet pestiin 4 kertaa  $50^\circ\text{C}$ :ssa 0,2X SSC:ssa, 0,1-prosenttisessa SDS:ssa 30 minuutin ajan ja kerran 2 x SSC:ssa huoneen lämpötilassa. Tämän jälkeen ne valotettiin yön yli Kodak XR-5 röntgensädekalvolla käyttämällä Dupont Cronex-vahvistusvarjostimia. Saatiin yhteensä 19 kloonia, jotka hybridisoitiin koettimen kanssa. Edellä kuvatulla tavalla (86) 6 rekombinantista valmistettiin faagi-DNA. Pesäkeseulontaa varten valittiin Pvu II fragmentin valmistamiseksi  $\lambda$ -klooni C. 30 ug DNA digestoitiin Pvu II entsyymillä kanssa 1 tunti  $37^\circ\text{C}$ :ssa ja elektroforesoitiin 1,0-prosenttisillä agarosigeeleillä. 4,2 kbp fragmentti, jonka aikaisemmin oli osoitettu sisältävän kudospasminogeenin aktivaattorisekvenssejä, elektroluoitiin ja puhdistettiin. Vakiomenetelmällä (83) valmistettiin  $^{32}\text{P}$ -leimattu koetin pesäkehybridisointeja varten, kuten on kuvattu infra.

d) Pesäkekirjostan seulonta 5' kudospasminogeenin aktivaattorisekvenssien suhteen.

Pesäkkeet siirrettiin maljoilta ja kasvatettiin nitroselluloosasuodattimilla. Jokaisen pesäkkeen DNA kiinnitettiin suodattimelle Grunstein - Hogness'in menetelmällä (69).  $^{32}\text{P}$ -leimattu koetin tehtiin priimaamalla vasikan kateenkorva (83) 4,2 kbp Pvu II fragmentti eristetyistä kudospasminogeenin aktivaattorin  $\lambda$ -genomikloonista. 1.500 transformanttia sisältävät suodattimet hybridisoitiin  $^{32}\text{P}$ -genomi-Pvu II fragmentin ( $112 \times 10^6$  cpm) kanssa. Hybridisointi suoritettiin 16 tunnin aikana käyttämällä Fritsch'in et al kuvaamia olosuhteita (82). Suodattimet pestiin hyvin ja sen jälkeen valotettiin Kodak XR-5 röntgensädekalvolla käyttämällä Dupont Lightning-Plus vahvistusvarjostimia. Jokaisesta näistä pesäkkeestä eristettiin plasmidi-DNA ja se sidottiin nitroselluloosasuodattimille ja hybridisoitiin alkuperäiseen

priimausreaktioon käytetyn  $^{32}\text{P}$ -leimatus syntetettisen oligonukleotidin (16-mer) kanssa. 18 kloonista hybridisoitiin 7 kinaasikäsitellyn 16-merin kanssa. Fragmenttien m13 vektoriksi mp<sup>7</sup> subkloonauksen jälkeen (73) osoitettiin sekvenssianalysoitaessa yhden kloonin (pPA17) sisältävän kudospasminogeenin aktivaattorin oikean 5' N-terminaalisen alueen, signaalijohtosekvenssin ja 84 bp 5'-transloimattoman alueen. Näistä kahdesta kloonista pPA25E10 ja pPA17 määritettiin täyspitkän kudospasminogeenin aktivaattorikloonin täydellinen nukleotidisekvenssi (kuvio 5) ja restriktiokartta (kuvio 4).

Natiivilla kudospasminogeenin aktivaattorimolekyyllä on mahdollisuus tulla stabiloiduksi 17 disulfidisillalla perustuen homologiaan muiden seriiniproteaasien kanssa. Potentiaalisia N-glykolysointikohtia on neljä, joista kolme sijaitsee "kringle-alueilla" koodissa asn<sub>117</sub>, asn<sub>184</sub> ja asn<sub>218</sub> ja yksi potentiaalinen kohta oligosakkaridiligandien rakennevariaatiot voivat olla syynä erilaisiin molekyyli-muotoihin (molekyyllipainot 65.000 ja 63.000).

#### E.1.I Täyspitkän kudospasminogeenin aktivaattori-cDNA-kloonin suora ekspressoituminen E.colissa

Koko koodaussekvenssi oli mahdollista muodostaa uudelleen käyttämällä kummankin osakloonin pPA17 ja pPA25E10 jakamaa yhteistä HhaI restriktioendonukleaasi-kohtaa. Plasmidista pPA17 eristettiin 55 bp Sau3AI-HhaI-restriktiofragmentti, joka vastasi aminohappoja 5-23. Sau3AI-restriktiokohdan sijainniksi saatiin oletetun valmiin koodaussekvenssin kodoni 4 ja sen avulla poistettiin signaalipeptidin koodausalue. Plasmidista pPA25E10 eristettiin myös 263 bp HhaI-NarI-fragmentti (koodaa aminohappoja 24-110). Muodostettiin kaksi syntetettistä deoksioligonukleotidiä, jotka entistävät kodonit aminohapoille 1-4, sisältävät ATG-translationalaisen aloituskodonin ja muodostavat EcoRI-koheesiopäätteen. Nämä kolme fragmenttia ligatoitiin tämän jälkeen yhteen 338 bp fragmentiksi, joka koodaa aminohappoja

1-110. Tämä fragmentti ja 1645 bp NarI-BglII fragmentti plasmidista pPA25E10 ligatoitiin sen jälkeen pLeIFAtpr103-plasmidin EcoRI ja BglII-kohtien välille niin, että muodostuu ekspressioplasmidi pt-PAtpr12. Kloonattu t-PA-geeni transkribitoidaan E.coli-trp-operonin 300 bp fragmentin kontrollona, joka sisältää trp-promoottorin, operaattorin ja trp-johtopeptidin Shine-Dalgarno-sekvenssin, mutta jolla ei ole johtopeptidin ATG-lähtökodonia (52).

Kasvatettiin E.coli K12 kantaa W3110 (ATCC n:o 27325), joka sisälsi plasmidin pt-PAtpr12, ja fibrinolyyttisen aktiivisuuden määrittämistä varten valmistettiin uutteen. Eräs kudospasminogeenin aktivaattoriaktiivisuuden mittaamiseen käytetty menetelmä on fibriinimaljamenetelmä (87). Tässä mitataan muodostunutta plasmiinimäärää mittaamalla, paljonko fibriini digestoi plasmiinia plasminogeenia ja fibriiniä sisältävällä agaroosimaljalla. Plasmiini muodostaa kirkkaan lyysivyöhykkeen fibriinimaljalla ja tämän näytteen pinta-ala voidaan korreloida kudospasminogeenin aktivaattorimäärään näytteessä. Kun pt-PAtpr12 klooneista saaduista uuteteista testataan kudospasminogeenin aktivaattoriaktiivisuus käyttämällä fibriinimaljamenetelmää, saadaan selvä kirkas lyysivyöhyke. Anti-t-PA-IgG inhiboi tätä fibrinolyyttistä aktiivisuutta päinvastoin kuin preimmuuni IgG tai anti-urokinaasi IgG. Aktiivisuutta ei havaita lainkaan uuteteesta, joka on valmistettu soluista, jotka sisältävät kontrollina leukosyytin interferoniplasmidia pLeIFAtpr103. Käyttämällä puhdistetusta t-PA-aktivaattorista standardikäyrää on mahdollista laskea, että uutettua aktiivisuutta saadaan noin  $20 \text{ yksikköä}/10^9 \text{ solua}$  (puhdistetulla t-PA-aktivaattorilla 90.000 Plough-yksikköä = 1 mg) (kuvio 10).

#### E.1.J Sekvenssianalyysi

Sekvenssianalyysi perustui Edman-hajotukseen (83b). Näyte laitettiin kuppisekvensoijan (Beckman 890B tai 890C spinning cup sequencer) kuppiin. Kupissa käytetty kantaja-aine oli

Polybrene<sup>TM</sup> (poly-N,N,N<sup>1</sup>N<sup>1</sup>-tetrametyyli-N-trimetyleenihexametyleenidiammoniumdiasetaatti) (63C). Sekvensointilaitetta oli modifioitu kylmäloukulla ja siihen oli tehty eräitä ohjelmamuutoksia taustapiikkien pienentämiseksi. Reagenssit olivat Beckman'in sekvensointipuskuri (0,1 M Quadrol-puskuri), fenyyli-isotiosyanaatti ja heptafluorivoihappo.

Talteenotetut Edman-syklit muunnettiin käsin 2-anilino-5-tiatsolinoni-johdoksiksi. 1-klooributaani kuivattiin typen alla. 2-anilino-5-tiatsolinoniin lisättiin 1,0 N suolahappoa vedessä ja kuumennettiin 70<sup>0</sup>C:ssa 10 minuuttia 3-fenyyli-2-tiohydantoiiniksi (PTH-johdos) muuntamista varten. Tämän jälkeen PTH-aminohappo-ryhmä liuotettiin 50-prosenttiseen aetonitriiliin ja veteen ja injisoitiin käänteisfaasiseen korkeapainenestekromatograafiin. Jokainen PTH-aminohappo tunnistettiin tämän jälkeen vertaamalla PTH-aminohappojen standardiseoksen, joka oli laitettu konversioastiaan ja käsitelty samalla tavoin kuin sekvensointilaitteesta saatu sykli, retentioaikoihin.

#### E.1.K. Kudosplasminogeenin aktivaattorin ekspressoitumisen havaintomenetelmät

##### 1. Plasmiinin muodostumisen suora määrittäminen

###### a. Teoria

Kudosplasminogeenin aktivaattori voidaan herkästi määrittää seuraamalla plasminogeenin muuttumista, jota kudosplasminogeenin aktivaattori katalysoi, plasmiiniksi. Plasmiini-entsyymille on olemassa kromogeenisia substraattimenetelmiä. Nämä määrittäykset perustuvat tripeptidin proteolyttiseen lohkaisemisiin kromoforisesta ryhmästä. Lohkaisunopeus on suorassa suhteessa sekä testattavan proteaasin spesifisyyteen että konsentraatioon. Analyysin perustana on se, että määritetään muodostuneen plasmiinin määrä sen jälkeen, kun kudosplasminogeenin aktivaattoria sisältävää liuosta on inkuboitu yhdessä plasminogeenin liuoksen kanssa. Mitä suurempi on

aktivaattorin määrä, sitä suurempi on muodostuneen plasmiinin määrä. Plasmiini mitataan seuraamalla sen lohkeamista kromogeenisesta substraatista S2251 (Kabi Group, Inc., Greenwich, CT).

#### b. Menetelmä

Sekoitetaan keskenään tasaosa näytettä ja 0,10 ml 0,7 mg/ml plasminogeenia (0,05M tris-HCl-puskuria, pH 7,4, jossa 0,012 M natriumkloridia) ja tilavuus säädetään 0,15 ml:ksi. Seosta inkuboidaan 37°C:ssa 10 minuuttia, lisätään 0,35 ml S2251 (1,0-millimoolinen liuos edellä mainitussa puskurissa ja reaktiota jatketaan 30 minuuttia 37°C:ssa. Reaktion päättämiseksi lisätään jääetikkaa (25 ul). Näytteet sentrifugoidaan ja mitataan absorbanssi aallonpituudella 405 nm. Aktiivisuusmäärä kvantitoidaan vertaamalla urokinaasi-standardiliuokseen. Täyspitkän kudospasminogeenin aktivaattorin havaitsemiseen käytettyjä määritysolosuhteita modifioitiin lisäämällä liuokseen fibrinogeenia (0,2 mg). Fibrinogeenituloksissa havaittu kudospasminogeenin aktivaattorin aktiivisuuden voimistuminen johtaa sen vuoksi jonkin verran suurempaan aktiivisuustasoon. Aktiivisuus ilmoitettiin Plough-yksiköissä, jolloin 90.000 Plough-yksikkö vastaa samaa aktiivisuutta kuin mikä on 1 mg:lla puhdistettua kudospasminogeenin aktivaattoria.

### 2. Plasmiinin muodostamisen epäsuora määrittäminen

#### a. Teoria

Kudospasminogeenin aktivaattoriaktiivisuudelle on kehitetty herkkä menetelmä (87). Menetelmä perustuu siihen, että määritetään plasmiinin muodostuminen mittaamalla, paljonko plasmiini digestoi fibriiniä agar-maljalla, joka sisältää fibriiniä ja plasminogeenia. Plasmiini muodostaa kirkkaan lyysivyöhykkeen fibriinimaljalla. Tämän lyysivyöhykkeen pinta-ala voidaan korreloida kudospasminogeenin aktivaat-

torimäärään näytteessä.

## b. Menetelmä

Granelli-Piperno'n ja Reich'in (87) menetelmän mukaisesti inkuboitiin maljoja 3,5 tuntia 37°C:ssa ja mitattiin lyysivyöhykkeet. Kudokset kvantitasoitiin vertaamalla urokinaasi-standardiliuokseen.

### E.1.1. Kudosplasminogeenin aktivaattoriaktiivisuuden havaitseminen

#### 1. Bakteereiden kasvu ja näytteen valmistaminen.

E.coli-pesäke, joka sisälsi plasmidin (pΔRIPA<sup>0</sup>), siirrostettiin koeputkeen, joka sisälsi 5 ml LB-kasvualustaa, jossa oli 20 ug/ml ampisilliinia. Soluja kasvatettiin yön yli 37°C:ssa. Tasaosa tästä viljelmästä laimennettiin suhteessa 1:100 300 ml:aan M9 mediumia, joka sisälsi 20 ug/ml ampisilliinia. Soluja kasvatettiin ravistelupullossa 4 tuntia 37°C:ssa, jolloin absorbanssiksi saatiin 0,419 (550 nm). Tryptofaanin kanssa analogista indoliakryylihappoa lisättiin niin, että konsentraatioksi saatiin 30 ug/ml. Soluja inkuboitiin 90 minuuttia, jolloin absorbanssiksi saatiin 0,628 (550 nm). Solut otettiin talteen sentrifugoimalla ja suspendoitiin uudelleen 0,8 ml:aan 0,01 M Tris-puskuria, pH 8,0, joka sisälsi 0,01 M EDTA. Saatua suspensiota sekoitettiin nopeasti huoneen lämpötilassa 18 tuntia. Näyte sentrifugoitiin ja supernatantista määritettiin kudosplasminogeenin aktivaattoriaktiivisuus.

pt-PATrpl2 ekspressoitumisen suhteen kuvion 10 yhteydessä esitettyä yksityiskohtaista kuvausta.

#### 2. Aktiivisuuden havaitseminen

Taulukoissa 1 ja 2 on esitetty vastaavien E.coli-uutteiden

aiheuttamat plasminogeenin aktivoitumistulokset. Syntyy aktiivisuutta, joka riippuu plasminogeenin läsnäolosta (taulukko 1). Kaniinin pre-immuniseerumi ei vaikuta tähän aktiivisuuteen, mutta sitä estää selvästi antiseerumi, joka kehitettiin puhdistetusta melanoomasolusta saatua kudospasminogeenin aktivaattoria vastaan (88) (taulukot 1 ja 2). Tämä osoittaa, että E.coli-uutteet tuottavat plasminogeenia aktivoivaa aktiivisuutta, jota inhiboivat kudospasminogeenin aktivaattorin vastaiset vasta-aineet.

Kuviossa 7 on esitetty fibrinolyyttisen aktiivisuuden fibriinimaljamäärityksen tulos. Urokinaasia lisättiin standardimäärä keskiriviin niin, että konsentraatiot olivat vasemmalta oikealle 0,24, 0,14, 0,10, 0,05 ja 0,02 Plough-yksikköä. Alimmassa rivissä ovat näytteet luonnon kudospasminogeenin aktivaattorista. Entsyymiä on kussakin kaivossa sama määrä. Kaivot sisältävät vasemmalta oikealle lueteltuna kudospasminogeenin aktivaattoria, anti-plasminogeenin aktivaattoria ja pre-immuniseerumia sekä kudospasminogeenin aktivaattoria yhdessä kudospasminogeenin aktivaattori-vasta-aineiden kanssa. Jokainen ylärivin kaivo sisältää 8 ul kudospasminogeenin rekombinanttiaktivaattoria sisältävää E.coli-uutetta. Ensimmäinen kaivo sisältää vain uutetta, toiseen kaivoon on lisätty preimmuuni-seerumia ja kolmanteen kaivoon kudospasminogeenin aktivaattorin vasta-aineita. Ilmeistä on, että preimmuuni-seerumi ei vaikuta luonnon kudospasminogeenin aktivaattoriin tai vastaavaan rekombinanttiaktivaattoriin ja että kudospasminogeenin aktivaattorin vasta-aineet inhiboivat sekä luonnon aktivaattoreiden että E.coli-uutteiden aktiivisuutta. Urokinaasistandardien perusteella uutteet sisältävät hieman alle 2,5 Plough-yksikköä ml:ssa. Tämä on hyvä tulos verrattuna taulukossa 1 saatuun arvoon, joka on 1,3 Plough-yksikköä/ml.

Taulukoissa 1 ja 2 on esitetty edellä kohdassa E.1.K.1.b. kuvatulla tavalla suoritettujen määritysten tulokset:

Taulukko 1. pAR1PA-pitoisten viljelmien E.coli-uutteiden aiheuttama plasminogeenin aktivoituminen

| Näyte                          | A <sup>405</sup> | Aktiivisuusprosentti <sup>1</sup> | Laskettu aktiivisuus, Plough-yksikköä/ml |
|--------------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|
| Näyte                          |                  |                                   |                                          |
| (ilman plasminogeeniä)         | 0,043            | (0)                               |                                          |
| Uute                           | 0,451            | (100)                             | 1,3                                      |
| Uute ja pre-immuuniseerumi     | 0,477            | 106                               | ---                                      |
| Uute ja anti-t-PA-vasta-aineet | 0,079            | 9                                 | ---                                      |

<sup>1</sup>Aktiivisuusprosentti laskettiin vähentämällä nolla-arvo (0,043) saaduista tuloksista ja jakamalla uutteesta saadulla tuloksella.

Taulukko 2. pt-PAt<sub>rpl2</sub>-viljelmien E.coli-uutteiden aiheuttama plasminogeenin aktivoituminen

| Näyte                          | A <sup>405</sup> | Aktiivisuusprosentti |
|--------------------------------|------------------|----------------------|
| Uute                           | 0,657            | (100)                |
| Uute ja preimmuuniseerumi      | 0,665            | 101                  |
| Uute ja anti-t-PA-vasta-aineet | 0,059            | 9                    |

Kuviossa 10 on esitetty fibriinimaljamäärityksen tulokset uutteista, jotka oli saatu E.coli'n, joka sisälsi kudosplasminogeenin aktivaattoria ekspressoivaa plasmidia, 10 l fermentaatioviljelmistä. Kudosplasminogeenin aktivaattoria sisältävän uutteen fibrinolyyttistä aktiivisuutta esittää kaivo A kuviossa 10. Anti-t-PA-IgG (kaivo C) inhiboi tätä fibrinolyyttistä aktiivisuutta päinvastoin kuin preimmuuni-IgG (kaivo B) tai anti-urokinaasi IgG (kaivo D). Mitään aktiivisuutta ei saada sellaisista soluista valmistetusta uutteesta, joka sisältää kontrollina leukosyytti-interferonin plasmidia

pLeIFAtRp103 (kaivo H).

E.2. tPA-aktivaattorin tuottaminen käyttämällä DHFR-proteiinia,  
jolla on alhainen sitoutumisaffiniteetti metotrekseksiin

### E.2.A Vektorin rakentaminen

Ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattoria (t-PA) koodaava sekvenssi insertoidaan seuraavalla menetelmällä (kts. kuvio 11) ekspressioplasmidiin, joka sisältää mutantti-DHFR-proteiinia, jolla on alhainen sitoutumisaffiniteetti metotrekseksiin; kts. tässä yhteydessä viitteenä mainittu vireillä oleva US-hakemus 459,151, jätetty 19.1.1983 (vastaa eurooppalaisia patenttihakemuksia julkaisua n:o 117,060).

Seuraavalla tavalla valmistettiin kolme fragmenttia päällekkäisistä t-PA-plasmideista pPA25E10, pPA17 ja ~~pARIPA9~~ (supra): Plasmidi pPA17 digestoitiin Dde I entsyymillä, täytettiin Klenow DNA polymeraasilla 1, katkaistiin Pst I entsyymillä; näin muodostunut noin 200 bp fragmentti, joka sisälsi 5' terminaalisen t-PA-sekvenssin, eristettiin. Toinen t-PA-fragmentti saatiin digestoimalla ~~pARIPA9~~ plasmidia Pst I ja Nar I entsyymeillä ja eristämällä noin 310 bp fragmentti. Kolmas t-PA-fragmentti saatiin digestoimalla pPA25E10 plasmidi Nar I ja Bgl II entsyymeillä ja eristämällä noin 1645 bp fragmentti, joka sisältää jonkin verran 3' translatoitumattomia sekvenssejä suuren t-PA-koodausalueosan kanssa.

Levinson et al, patenttihakemus n:o 326,980, jätetty 3.12.1981 (mainittu tässä yhteydessä viitteenä), on kuvannut plasmidin pE342, joka ekspressoii HBV-pinta-antigeenin (käytetään myös nimitystä pHBs348-E). (Alkukohta Simian-viruksesta SV40 eristettiin digestoimalla SV40 DNA HindIII entsyymillä ja muuntamalla HindIII päät EcoRI-päiksi lisäämällä konvertteria (AGCTGAATTC)). Tämä DNA katkaistiin PvuII:lla ja lisättiin RI-liittäjät. EcoRI-digestoinnin jälkeen alkukohdan kattavat 348 emäsparin fragmentti elektroforesoitui ja elektroeluotiin polyakryyliamidigeelillä ja kloonattiin pBr322:een. Ekspressioplasmidi pHBs348-E rakennettiin kloo-

hakemus  
 EU-pat.  
 n:o 326,980

naamalla 1986 emäsparin fragmentti, joka oli saatu EcoRI- ja BglII-digestoimalla HBV (Animal Virus Genetics, (Ch. 5) Acad. Press, N.Y. (1980)) (joka kattaa HBsAG:n koodaavan geenin), plasmidi pML (Lusky et al., Nature, 293: 79 (1981)) EcoRI- ja BstHI-kohdissa. (pML on pBR322-johdos, jolla on deletion poistavat sekvenssit, jotka estävät plasmidin replikoitumisen apinan soluissa). Tämän jälkeen suoristettiin saatu plasmidi (pRI-Bgl) EcoRI-entsyymillä ja pRI-Bgl-plasmidin EcoRI-kohtaan vietiin 348 emäsparin fragmentti, jossa on SV40 alkukohta-alue. Alkukohta-fragmentti voi insertoitua kumpaankin suuntaan. Koska tämä fragmentti koodaa replikoitumisen alkukohdan lisäksi alku- ja loppu-SV40-promootoreita, HBV-geenit voisivat ekspressoitua jomman kumman promoottorin kontrollin alaisena riippuen tästä suunnasta (pHBS348-E, jossa on HBs, ekspressoitu alkupromoottorin kontrollin alaisena). pE342 modifioidaan osittain digestoimalla EcoRI-entsyymillä, täyttämällä lohkaistu kohta Klenow DNA polymeraasin I avulla ja ligatoimalla plasmidi takaisin kokoon, jolloin näin poistetaan EcoRI-kohta, joka on SV40-alkukohdan edellä pE342:ssa. Saatu plasmidi, josta käytetään merkintää pE342 $\Delta$ RI, digestoidaan EcoRI-entsyymillä, täytetään käyttämällä Klenow DNA polymeraasia I ja katkaistaan BamHI-entsyymillä. Elektroforeesi käsitellään Karyyliamidigellillä, elektroluodaan noin 3500 bp fragmentti, uutetaan fenolilla ja kloroformilla ja saostetaan etanolilla.

Näin valmistettu p342E 2500 bp vektori ja edellä kuvatut tPA-fragmentit, jotka sisälsivät noin 2160 emäsparia, ligatoitiin yhteen standardimenetelmillä. Plasmidi, joka sisälsi nämä kolme tPA-koodaavaa fragmenttia oikeassa suunnassa, eristettiin, karakterisoitiin ja nimettiin pE342-t-PA-plasmidiksi. Tämä plasmidi digestoitiin SacII-entsyymin kanssa ja käsiteltiin bakteeriperäisellä alkalisella fosfataasilla (BRL). DHFR-sekvenssin aikaansaamiseksi (yhdessä tämän ekspression kontrollisekvenssien kanssa) muodostettiin noin 1700 bp fragmentti SacII-digestoimalla pEHER. (pEHER on mutanttia DHFR ekspressoiva plasmidi, joka on kuvattu

US-patentissa 459,151 (supra). Tämä fragmentti ligatoitiin pE342-t-PA-plasmidiin, jolloin saatiin ~~pE342-t-PA~~<sup>pETPAER</sup>400-plasmidi, joka on muutoin analoginen pEHER-plasmidin kanssa paitsi, että t-PA-aktivaattorista saadut cDNA-sekvenssit ovat korvanneet HBsAg-koodausalueen.

#### E.2.B t-PA-sekvenssin ekspressoituminen ja vahvistuminen

pETPAER400 (pETPER) transfektoitiin sekä dhfr<sup>-</sup> CHO-DUX B11 soluihin että DHFR<sup>+</sup> CHO-K1 (ATCC CCL61) soluihin Graham'in ja Van der Eb'in menetelmällä (supra). Transformoitujen dhfr<sup>-</sup>-solujen selektoimiseen käytettiin kasvua alustalla, joka oli vajaa glysiinin, hypoksantiinin ja tymidiinin suhteen. Transformoitujen DHFR<sup>+</sup>-solujen selektoimiseen käytettiin kasvua  $\geq 100$  nm metotreksaani<sup>1</sup>ssa. Kyseisestä valinta-alustasta kasvaneet pesäkkeet eristettiin käyttämällä pesäkerenkaita ja niitä kasvatettiin samassa alustassa useiden sukupolvien ajan.

Vahvistamista varten pesäkkeiden solut jaetaan alustoihin, jotka sisältävät metotreksaattia  $5 \times 10^4$ ,  $10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  ja  $10^6$  nM, ja siirretään useita kertoja. Solut maljataan hyvin alhaisilla solutiheyksillä ( $10^2$ - $10^3$  solua/malja) 10 cm maljoihin ja eristetään saadut pesäkkeet.

#### E.2.C Määrittäminen menetelmät

t-PA-aktivaattorin ekspressoituminen transfektoiduissa vahvistetuissa pesäkkeissä voidaan tarkoituksenmukaisesti määrittää samantlaisilla menetelmillä kuin on esitetty kohdassa ~~E.1.K.1.b.~~<sup>E.1.K.1.b.</sup> (supra).

DHFR- ja t-PA-sekvenssien vahvistuminen yhdessä määritetään eristämällä vahvistettujen pesäkkeiden massamaisista monokerroksista DNA:ta seuraavasti: Massamaiset monokerrokset 150 mm maljoilla pestään 50 ml:lla steriiliä PBS ja lyysataan lisäämällä 5 ml seosta, jossa on 0,1 % SDS, 0,4 M CaCl<sub>2</sub>

ja 0,1 M EDTA, pH 8. 5-10 minuutin kuluttua seos poistetaan, uutetaan fenolilla, uutetaan kloroformilla ja saostetaan etanolilla. DNA suspendoidaan uudelleen 1 ml:aan (150 mm maljaa kohti) seosta, joka sisältää 10 mM Tris-HCl-puskuria, pH 8,1 ja 1 mM EDTA (TE). Lisätään RNasea 0,1 mg/ml ja liuosta inkuboidaan 30 minuuttia 37°C:ssa. tämän jälkeen lisätään 0,1 % SDS ja pronaasia (Sigma) 0,5 mg/ml. Inkuboidaan 37°C:ssa 3-16 tuntia ja liuos uutetaan uudelleen fenolilla, uutetaan kloroformilla ja saostetaan etanolilla. DNA-pelletti suspendoidaan uudelleen 0,5 ml:aan vettä ja digestoidaan restriktioentsyymeillä. Noin 5-10 ug digestoitua DNA elektroforesoidaan agarosigeelillä /1 % agarosia Tris-asetatti-puskurissa (40 mM Tris, 1 mM EDTA, säädetty pH-arvoon 8,2 etikkahapolla)/; Crouse, et al, J. Biol. Chem., 257: 7887 (1982)). Sen jälkeen kun sininen bromifenoliväri oli kulkeutunut 2/3 alas geeliä, geeli poistetaan ja värjätään etidiumbromidilla. DNA tehdään näkyväksi ultraviolettivalolla ja DNA siirretään geelistä nitroselluloosasuodattimille Southern-menetelmällä (J. Mol. Biol. 98: 503. (1975)). Sen jälkeen suodattimet hybridisoidaan nick-transloidulla koettimella, joka on valmistettu pEHER-plasmidin 1700 bp SacII-fragmentista (valmistettu ja hybridisoitu edellä kuvatulla tavalla), tai pETPER-plasmidin noin 1970 bp Bgl II-fragmentita.

### E.3 t-PA-aktivaattorin valmistaminen käyttämällä villityypistä DHFR-proteiinia

#### E.3.A. Vektorin rakentaminen

Plasmidi (pETPFR), joka sisälsi villityypistä DHFR-proteiinia koodaavan DNA-sekvenssin, rakennettiin samalla tavoin kuin mitä tehtiin pETPFR-plasmidin muodostamisessa. Tämä rakentaminen tapahtui samalla tavoin kuin mitä on kuvattu esimerkissä E.2.A. C.1.A paitsi, että pEHER-plasmidin asemesta DHFR-proteiinigeenisekvenssin lähteenä käytettiin pE342.HBV.E400.D22-

plasmidia, joka on kuvattu vireillä olevassa patentissa Genentech Docket n:o 100/92. pE342.HBV.E400.D22-plasmidi on sama kuin pEHER paitsi, että villityyppisen ja mutantti-DHFR-proteiinin välillä on yhden emäsparin ero. Näin saatu pETPFR-plasmidi on kaikin tavoin muutoin analoginen pETPER-plasmidin kanssa paitsi, että mutanttia koodaava sekvenssi on korvattu villityyppistä DHFR-proteiinia koodaavalla DNA-sekvenssillä.

### E.3.B t-PA-sekvenssin ekspressoituminen

pETPFR-plasmidilla transfektoitiin DHFR-vajaat CHO-solut (Urlaub ja Chasin (supra)) käyttämällä Graham'in ja Van der Eb'in kalsiumfosfaatti-saostumenetelmää. Selektiivisellä alustalla (-HGT) muodostuneesta 21 pesäkkeestä määritettiin plasmiinin muodostuminen digestoimalla fibriini agarmaljalla, joka sisälsi fibriiniä ja plasminogeeniä, Granelli-Piperno'n et al. kuvaamalla menetelmällä J. Exp. Med., 148: 223 (1978).

E.1.K.1.b

Tämän jälkeen määritettiin kohdassa D-2.C. esitetyllä menetelmällä neljän <sup>viimekkäimman</sup> ~~parhaan~~ positiivisen kloonin plasmiinin muodostamiskyky kvantitatiivisesti solua kohti.

Tässä kvantitatiivisessa määrittämisessä havaittiin, että nämä neljä testattua kloonia erittivät t-PA-aktivaattoria alustaan samat tai verrattavat määrät ilmoitettuna yksikkö/solu/päivä. Subkloonit valmistettiin siirtämällä ympit kahdesta kloonista erillisiin maljoihin, jotka sisälsivät -HGT-alustaa. Jatkoanalyysissä käytettiin kahta saatua subkloonia, 18B ja 1.

### E.3.C Vahvistaminen ja t-PA-tuottomäärät

Vahvistumisen edistämiseksi maljattiin edellä mainittuja subklooneja  $2 \times 10^5$  solua 100 mm maljoja kohti 50 nM metotreksaanissa. Eloojääneistä soluista suodatettiin edellä

kuvattu määrittäminen, jolloin ne kaikissa tapauksissa tuottivat kudospasminogeenin aktivaattoriaktiivisuutta noin 10 kertaa vahvistamattomaan määrään verrattuna. Näistä kloonista valittiin jatkotutkimuksiin kaksi ja niille annettiin nimet 1-15 ja 18B-9.

Subklooni 1-15 vahvistettiin edelleen siirrostamalla  $2 \times 10^5$  solua 100 mm maljoihin, jotka sisälsivät 500 nM metotreksaania. Näin vahvistetut solut tuottivat määrityksen perusteella vieläkin enemmän (noin 3 kertaa) t-PA-aktivaattoria; kohdan C.1.C kvantitatiivinen määrittäminen antoi määriksi noin  $7 \times 10^{-4}$  yksikköä/solu/päivä. Sen jälkeen siirrostettiin osa näistä vahvistetuista soluista ja säilytettiin 10.000 nM metotreksaanin läsnäollessa. Subkloonit 1-15 ja 18B-9 testattiin edelleen sen jälkeen, kun niitä oli säilytetty noin 1-2 kuukautta taulukossa 1' annetuissa olosuhteissa.

Taulukko 1'

| <u>Solulinja</u>       | <u>Kasvun olosuhteet</u> | <u>t-PA/solu/päivä<sup>*</sup>, ng</u> |
|------------------------|--------------------------|----------------------------------------|
| 1-15 <sub>500</sub>    | 500nM MTX                | $28,5 \times 10^{-3}$                  |
| 1-15 <sub>500</sub>    | 500nM MTX                | $26,0 \times 10^{-3}$                  |
| 1-15 <sub>500</sub>    | (-HGT-alusta, ei MTX)    | $8,3 \times 10^{-3}$                   |
| 1-15 <sub>500</sub>    | (-HGT-alusta, ei MTX)    | $18,0 \times 10^{-3}$                  |
| 1-15 <sub>10.000</sub> | 10 $\mu$ M MTX           | $29,3 \times 10^{-3}$                  |
| 1-15 <sub>10.000</sub> | 10 $\mu$ M MTX           | $49,0 \times 10^{-3}$                  |
| 18B-9                  | 50 nM MTX                | $14,3 \times 10^{-3}$                  |
| 18B-9                  | 50 nM MTX                | $14,4 \times 10^{-3}$                  |
| 18B-9                  | (-HGT-alusta, ei MTX)    | $14,3 \times 10^{-3}$                  |
| 18B-9                  | (-HGT-alusta, ei MTX)    | $14,4 \times 10^{-3}$                  |
| 1                      | (-HGT-alusta, ei MTX)    | $1,0 \times 10^{-3}$                   |
| 1                      | (-HGT-alusta, ei MTX)    | $0,7 \times 10^{-3}$                   |

\* Kasvatusalustaa t-PA määritettiin kvantitatiivisesti radioimmunomenetelmällä seuraavasti: Puhdistettu t-PA ja puhdistettu jodattu t-PA-merkkiaine melanoomasoluista sarjalaimennettiin niin, että konsentraatiot olivat 12,5 - 400 ng/ml, puskuriin, joka sisälsi fosfaattupuskuroitua suolaliuosta, pH 7,3, 0,5 % härän seerumialbumiinia, 0,01 % Tween 80 ja 0,02 % NaN<sub>3</sub>. Radioaktiivisesti leimattuihin merkkiaineproteiineihin lisättiin sopivat laimennukset määritettävistä alustanäytteistä. Antigeenien annettiin inkuboitua yön yli huoneen lämpötilassa, kun mukana oli kaniinin anti-t-PA-antiseerumin IgG-jakeen 1:10.000 laimennusta. Vasta-aine-antigeeni-kompleksi saostettiin absorboimalla 2 tunnin ajan huoneen lämpötilassa vuohen anti-kaniini-IgG-immunohelmille (BioRad). Helmet kirkastettiin lisäämällä laimentimena suolaliuosta, minkä jälkeen sentrifugoitiin 10 minuuttia (2000 x g) 4°C:ssa. Supernatantit heitettiin pois ja määritettiin radioaktiivisuus sakoissa. Konsentraatiot määritettiin vertaamalla referenssistandardiin.

Solulinjat ovat seuraavat: Solulinja "1" on vahvistamaton kloonin alkuperäisestä neljän kloonin ryhmästä. "1-15<sub>500</sub>" on solulinjan "1" vahvistettu subkloonin, joka vahvistettiin ensin 50 nM metotreksaatissa subklooniksi 1-15 ja sen jälkeen siirrettiin edelleen vahvistettavaksi 500 nM metotreksaaniin. 1-15<sub>10.000</sub> on 1-15<sub>500</sub> subkloonin, joka oli edelleen vahvistettu 10.000 nM metotreksaatissa. Solulinja 18B-9 on neljän alkuperäisen kloonin yhden kloonin subkloonin, jota oli vahvistettu 50 nM metotreksaatissa.

Kaikilla vahvistetuilla soluilla on t-PA-tuotto kasvanut verrattuna vahvistamattoman soluviljelmän tuottoon. Jopa vahvistamatonkin viljelmä tuottaa suurempia t-PA-määriä kuin 0,5 pg/solu/päivä; vahvistamalla päästään lähes 50 pg/solu/päivä suuruisiin määriin.

#### F. Farmaseuttiset seokset

Farmaseuttisesti hyödyllisiä yhdistelmiä voidaan valmistaa

tämän keksinnön mukaisista yhdisteistä formuloimalla ne tunnetuilla menetelmillä. Tällöin tuotettu ihmiskudoksen plamsinogeeniaktivaattori yhdistetään farmaseuttisesti sopivan kantaja-väliteaineen kanssa. Sopivia väliteaineita ja niiden formulointia, mukaanlukien muita ihmisproteiineja, esimerkiksi ihmisen seerumialbumiinia, on kuvannut esimerkiksi E.W. Martin teoksessa Remington's Pharmaceutical Sciences, joka tässä yhteydessä mainittakoon viitteenä. Tällaiset seokset sisältävät tehokkaan määrän tätä proteiinia yhdessä sopivan määrän kanssa väliteainetta niin, että voidaan valmistaa farmaseuttisesti hyväksyttäviä seoksia, jotka voidaan tehokkaasti antaa isäntäeläimelle.

Ihmiskudoksen plamsinogeenin aktivaattoria voidaan esimerkiksi antaa parenteraalisesti henkilöille, jotka kärsivät kardiovaskulaarisista taudeista tai tiloista. Annostus ja annosmäärä voivat olla samanlaiset kuin mitä tällä hetkellä käytetään kliinisisissä tutkimuksissa muita kardiovaskulaarisia, trombolyyttisiä aineita, esimerkiksi noin 440 IU/kg intravenöösinä perusannoksena, minkä jälkeen infuusoidaan jatkuvasti intravenööstisti noin 440 IU/kg/tunti 12 tunnin ajan pulmonaarisesta embolismista kärsivillä potilailla.

Eräs esimerkki tässä yhteydessä sopivasta, oleellisesti homogeenisesta ihmiskudoksen plasminogeenin aktivaattorin annostusmuodosta parenteraalisessa muodossa on lääkepullonen, jossa kudospasminogeenin aktivaattorin aktiivisuutta on 25000 IU-yksikköä, 25 mg mannitolia ja 45 mg natriumkloridia. Tämä voidaan rekonstituoida 5 ml:lla steriiliä injektiovettä ja sekoittaa sopivan tilavuuden kanssa intravenöösiin antamiseen tarkoitettua, 0,9-prosenttista natriumkloridi-injektiooliuosta tai 5-prosenttista dekstroosi-injektiooliuosta.

#### G. Ihmisen rekombinantti-t-PA-aktivaattorin yksityiskohtainen kuvaus

Näissä esimerkeissä valmistetun ihmisen t-PA-aktivaattorin tämän suoritusmuodon rakennetta on osittain tutkittu yksityiskohtaisesti, sekä selvittämällä geenää koodaava sekvenssi että proteiini-biokemian keinoin. Tämänhetkinen näkemys proteiinin rakenteesta on esitetty kuviossa 12.

Collen ja hänen työtoverinsa (88) ovat aikaisemmin osoittaneet, että keksiketjuista ihmisen t-PA-aktivaattoria muodostuu, kun lohkaistaan proteolyytteisesti yksiketjuinen molekyyli kahdeksi, disulfidididoksen yhdistämäksi polypeptidiksi. Käsillä olevan työn perusteella voidaan päätellä, että raskas ketju (molekyylipaino 30882) saadaan  $\text{NH}_2$ -terminaalista osasta, ja kevyt ketju (molekyylipaino 28126) käsittää COOH-terminaalisen alueen. Tämän kaksiketjuisen molekyylin N-terminaalinen sekvenssointi viittaa siihen, että kaksiketjuinen muoto muodostuu yhden arginyyli-isoleusiini-sidoksen lohjetessa (kuvio 12; merkitty nuolella).

Ihmisen t-PA-aktivaattorin raskaan ketjun erään osan primäärinen rakenne osoittaa suurta sekvenssihomologisuutta plasminogeenin (89) ja protrombiinin (40, 41) "kringle-alueiden" kanssa. "Kringlet-alue" tarkoittaa tunnusomaista kolminkertaista disulfidirakennetta, joka alkuaan löydettiin protrombiinin "pro"-fragmentissa ja jota ensimmäiseksi kuvasi yksityiskohtaisesti Magnusson *et al.* (91, 92). t-PA-aktivaattorin primäärisestä sekvenssistä nähdään kaksi nk. "kringle-aluetta", joissa kummassakin on 82 aminohappoa ja jotka ovat hyvin homologisia plasminogeenin 5 "kringle-alueiden" kanssa. Loput 91 N-terminaalista aminohappoa ovat vain vähän homologisia tavanomaisen "kringle-alueen" kanssa. Voidaan kuitenkin spekuloida, että tällä alueella voi olla myös useita disulfidididoksia sisältävä rakenne, koska sieltä on löydetty 11 muuta kysteiiniryhmää.

Ihmisen t-PA-aktivaattorin kevyen ketjun katalyyttisen kohdan, nk. seriini-proteaasialueen, muodostaa, kuten muissakin seriinientsyymeissä, todennäköisimmin histidiini<sub>322</sub>-, asparagiini<sub>371</sub>- ja seriini<sub>478</sub>-ryhmät. Näitä

ryhmiä ympäröivät aminohapposekvenssit ovat lisäksi hyvin homologisia muiden seriiniproteaasien, kuten trypsiinin, protrombiinin ja plasminogeenin vastaavien osien kanssa.

Siitä huolimatta, että tässä yhteydessä on viitattu tiettyihin, hyvänä pidettyihin suoritusmuotoihin, tämä keksintö ei luonnollisesti rajoitu niihin vaan patenttivaatimusten lailliseen piiriin.

#### Kirjallisuus

1. US-patentti n:o 3355361.
2. US-patentti n:o 3926727.
3. US-patentti n:o 4029767.
4. US-patentti n:o 4258030.
5. US-patentti n:o 4271150.
6. Eurooppalainen patenttihakemus, julk. n:o 0037687.
7. Rijken, D.C., "Plasminogen Activator from Human Tissue", Krips Repro Meppel, 1980.
8. US-patentti n:o 3555000.
9. US-patentti n:o 3998947.
10. US-patentti n:o 4245051.
11. Eurooppalainen patenttihakemus, julk. n:o 0023860.
12. US-patentti n:o 4083961.
13. US-patentti n:o 4177262.

14. US-patentti n:o 3082612.
15. Wallen, P., Proc. Serono Symp. 9, 91 (1977).
16. Thorsen, S., et al., Thrombos. Diathes. haemorrh. 28, 65 (1972).
17. Collen, Thrombos. Haemostas. 43, 77 (1980).
18. Wiman et al., Nature 272, 549 (1978).
19. Eurooppalainen patenttihakemus, julk. n:o 0041766.
20. Weimar, W., et al, The Lancet Vol. II, n:o 8254, s. 1018 (1981).
21. Brittiläinen patenttihakemus, julk. n:o 2007676A.
22. Wetzel, American Scientist 68, 664 (1980).
23. Microbiology, 2. painos, Harper and Row Publications, Inc., Hagerstown, Maryland (1973), erit. sivut 112 et seq.
24. Scientific American 245, 106 (1981).
25. Brittiläinen patenttihakemus, julk. n:o 2055382A.
26. Saksalainen <sup>hakemus-</sup>~~kuulutus~~ julkaisu 264432.
27. Chang et al., Nature 275, 617 (1978).
28. Itakura et al., Science 198, 1056 (1977).
29. Goeddel et al., Nucleic Acids Research 8, 4057 (1980).
30. Eurooppalainen patenttihakemus, julk. n:o 0036776.

31. Siebenlist et al., Cell 20, 269 (1980).
32. Stinchcomb et al., Nature 282, 39 (1979).
33. Kingsman et al., Gene 7, 141 (1979).
34. Tschumper et al., Gene 10, 157 (1980).
35. Mortimer et al., Microbiological Reviews 44, 519 (1980).
36. Mortimer et al., Journal of Bacteriology 134, 48 (1978).
37. Jones, Genetics 85, 23 (1977).
38. Hitzeman, et al., J. Biol. Chem. 255, 12073 (1980).
39. Hess et al., J. Adv. Enzyme Regul. 7, 149 (1968).
40. Holland et al., Biochemistry 17, 4900 (1978).
41. Bostian et al., Proc Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 4504 (1980).
42. The Molecular Biology of Yeast (elok. 11-18, 1981), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
43. Chmabon, Ann. Rev. Biochemistry, 44, 613 (1975).
44. Tissue Culture, Academic Press, toim. Kruse ja Patterson, (1973).
45. Gluzman, Cell 23, 175 (1981).
46. Bolivar et al., Gene 2, 95 (1977).
47. Lusky et al., Nature 293, 79 (1981).

48. Gluzman et al., Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 44, 293 (1980).
49. Fiers et al., Nature 273, 113 (1978).
50. Reddy et al., Science 200, 494 (1978).
51. Crea et al., Nucleic Acids Research 8, 2331 (1980).
52. Goeddel et al., Nature 287, 411 (1980).
53. Gray et al., Nature 295, 503 (1982).
54. Oppermann et al., Virology 108, 47 (1981).
55. Ward et al., J. Virol. 9, 61 (1972).
56. Aviv et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69, 1408 (1972).
57. Lehrach et al., Biochemistry 16, 4743 (1977).
58. Lynch et al., Virology 98, 251 (1979).
59. Lodish, Am. Rev. of Biochem. 45, 40 (1976).
60. Pelham et al., Eur. J. Biochem. 43, 247 (1976).
61. Blobel, et al., J. Cell Biology 67, 852 (1975).
62. Chiels et al., J. Biol. Chemistry 253, 3753 (1978).
63. Laemmli, Nature 227, 680 (1970).
64. Bonner et al., Eur. J. Biochem. 46, 83 (1974).
65. Goeddel et al., Nature 281, 544 (1979).

66. Wickens et al., J. Biol. Chem. 253, 2483 (1978).
67. Chang et al., Nature 275, 617 (1978).
68. Bolivar et al., Gene 2, 95 (1977).
69. Grunstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3961 (1975).
70. Hanahan et al., Gene 10, 63 (1980).
71. Birnboim et al., Nucleic Acids Res. 7, 1513 (1979).
72. Smith, Methods Enzymol. 65, 499 (1980).
73. Messing et al., Nucleic Acids Res. 9, 309 (1981).
74. Maxam et al., Methods in Enzymol. 65, 499 (1980).
75. Crea et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5765 (1978).
76. Lawn et al., Cell 15, 1157 (1978).
77. Southern, J. Mol. Biol. 98, 503 (1975).
78. Benton et al., Science 196, 180 (1977).
79. McGrath ja Levinson, Nature 295, 423 (1982).
80. Blin et al., Nucleic Acid Res. 3, 2303 (1976).
81. Lawn et al., Science 212, 1159 (1981).
82. Fritsch et al., Cell 19, 959 (1980).
83. Taylor et al., Biochem. Biophys. Acta 442, 324 (1976).

- 83b. Edman et al., European J. Biochem. 1, 80 (1967).
84. Denhardt, Biochem. Biophys. Res. Comm. 23, 641 (1966).
85. Wahl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 3683 (1979).
86. Davis et al., Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1980).
87. Granelli-Piperno et al., J. Exp. Med. 148, 223.
88. Rijken et al., J. Biol. Chem. 256, 7035 (1981).
89. Sottrup-Jensen et al., Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Vol. 3, Raven Press, N.Y. s. 191 (1978).
90. Sothrup-Jensen et al., Proc. natl. Acad. Sci. (USA) 72, 2577 (1975)
91. Magnussen et al., Proteolysis and Physiological Regulation, toim. Ribbons et al., Academic Press, New York, s. 203 (1976).
92. Magnussen et al., Proteases and Biological Control, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., s. 123 (1975).
93. Miller, Experiments in Molecular Genetics, s. 431-3, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York (1972).
94. Recih, E., Proteases and Biological Control, (Ibid) s. 333-341.
95. Matsuo, O., et al., Throm. Haemostasis 45 225 (1981).

96. Koringer, C., et al., Throm. Haemostasis 46 561, 662 (1981).
97. Hoylaerts, M., et al., J. Biol. Chem. 257 2912 (1982).
98. Koringer, C., et al., Thromb. Haemostasis 46 685 (1981).

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä, joka käsittää proteiinin valmistuksen, jolla proteiinia on ihmisen t-PA-funktio, erityisesti se kykenee  
 5 katalysoimaan plasminogeenin muuntamisen plasmiiniksi, se si-  
 toutuu fibriiniin ja luokitellaan t-PA:ksi immunologisten omi-  
 naisuuksien perusteella, ekspressoimalla rekombinantti-isäntä-  
 solussa proteiinia koodaavaa transformoitavaa DNA:ta, t u n -  
 n e t t u siitä, että proteiini sisältää 527 aminohapon sek-  
 10 venssin N-terminaalaisesta seriinistä C-terminaaliseen prolii-  
 niin, joka on koodattavissa cDNA:lla, joka on peräisin Bowes-  
 melanoomasolulinjasta uutetusta mRNA:sta, ja joka

(a) omaa kuvassa 4 esitetyn restriktiokaavion oletettavasti  
 15 kypsää kudospasminogeeniaktivaattorisekvenssiä varten, ja  
 (b) hybridisoitu voimakkaasti sekvenssin kanssa:

(i) 5'-TCACAGTACTCCCA-3'

(ii) 5'-TTCTGAGCACAGGGCG-3'

20 (iii) 4,2 ke Pvu II fragmentti ihmisgenomi-DNA:sta, joka  
 hybridisoituu voimakkaasti sekvenssin kanssa:

30

40

CGG GTG GAA TAT TGC TGG TGC AAC AGT GGC AGG GCA CAG TGC CAC TCA

25

50

60

GTG CCT GTC AAA AGT TGC AGC GCG CCA AGG TGT TTC AAC GGG GGC ACC

66

TGC CAG CAG GCC CTG T.

30 (2. Menetelmä, joka käsittää proteiinin valmistuksen, jolla  
 proteiinia on ihmisen t-PA-funktio, erityisesti se kykenee  
 katalysoimaan plasminogeenin muuntamisen plasmiiniksi, se si-  
 toutuu fibriiniin ja luokitellaan t-PA:ksi immunologisten omi-  
 naisuuksien perusteella, ekspressoimalla rekombinantti-isän-  
 35 täsolussa proteiinia koodaavaa transformoitavaa DNA:ta, t u n -  
 n e t t u siitä, että proteiini sisältää alleelin tai johdan-

naisen, joka on saatu patenttivaatimukset 1 mukaisen 527 aminohapposekvenssin aminohappodeletoimalla, -substituoinnilla, -insertoinnilla, -lisäyksellä tai -korvauksella.

5 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n -  
n e t t u siitä, että tuotetaan polypeptidi, johon ei liity  
ihmisen kudospasminogeeniaktivaattorin luontaista glykosyloi-  
tia.

10 4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n -  
n e t t u siitä, että isäntäsolu on E.coli-kanta.

5. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n -  
n e t t u siitä, että isäntäsolu on nisäkäsperäinen.

15

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u  
siitä, että isäntäsolu on kiinalaisen hamsterin munasarjasolu-  
linja.

20 7. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n -  
n e t t u siitä, että siihen kuuluu proteiinin talteenotto ja  
puhdistus.

8. Menetelmä, joka seuraa kudospasminogeeniaktivaattorifunk-  
25 tiota omaavan proteiinin valmistusta jonkin patenttivaatimuksen  
1 - 7 mukaisella menetelmällä, t u n n e t t u siitä, että  
siihen kuuluu mainitun proteiinin käyttö valmistettaessa far-  
maseuttisia valmisteita.

30 9. DNA-isolaatti, joka koodaa mainitun proteiinin, joka on  
valmistettu vaatimuksen 1 tai 2 mukaisella menetelmällä.

10. Rekombinanttikloonausvektori, joka sisältää DNA:ta, joka  
koodaa mainitun proteiinin, joka on valmistettu patenttivaati-  
35 muksen 1 tai 2 mukaisella menetelmällä.

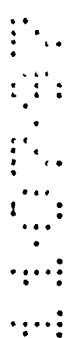
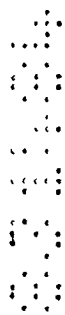
11. Rekombinanttiekspressiovektori, joka sisältää DNA:ta, joka koodaa mainitun proteiinin, joka on valmistettu patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisella menetelmällä, ja joka kykenee transformoidussa mikro-organismissa tai solulinjassa ekspressoimaan  
5 koodaavan sekvenssin vastaavan polypeptidin tuottamiseksi.

12. Mikro-organismi tai soluviljelmä, joka on transfektoitu DNA:lla, joka koodaa mainitun proteiinin, joka on valmistettu patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisella menetelmällä ja joka  
10 kykenee ekspressoimaan sitä mainitun proteiinin tuottamiseksi.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen mikro-organismi, t u n -  
n e t t u siitä, että se on E.coli-kanta.

15 14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen soluviljelmä, t u n n e t -  
t u siitä, että se on nisäkkään solulinja.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen soluviljelmä, t u n n e t -  
t u siitä, että solulinja on kiinalaisen hamsterin munasarjan  
20 solulinja.



Patentkrav

1. Förfarande, som består av framställning av protein, vilket protein uppvisar human t-PA-funktion, särskilt förmår det katalysera konversionen av plasminogen till plasmin, det binder vid fibrin och klassas som t-PA på basen av immunologiska egenskaper, genom expression i en rekombinant-värdcell av protein kodande transformerbar DNA, k ä n n e t e c k n a t därav, att proteinet innehåller en sekvens av 527 aminosyror från N-terminalt serin till C-terminalt prolin, som kan kodas med cDNA härledd från mRNA extraherad från Bowes-melanomcellinjen och som

- (a) har restriktionsmönstret enligt figur 4 för den förmodat mogna vävnadsplasminogenaktivatorsekvensen, och  
(b) hybridiserar kraftigt med sekvensen:

- (i) 5'-TCACAGTACTCCCA-3'  
(ii) 5'-TTCTGAGCACAGGGCG-3'  
(iii) 4,2 kb Pvu II fragment av human genom-DNA, som hybridiserar kraftigt med sekvensen:

|                                                                 |    |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|
| 30                                                              |    | 40 |
| CGG GTG GAA TAT TGC TGG TGC AAC AGT GGC AGG GCA CAG TGC CAC TCA |    |    |
| 25                                                              | 50 | 60 |
| GTG CCT GTC AAA AGT TGC AGC GCG CCA AGG TGT TTC AAC GGG GGC ACC |    |    |
|                                                                 | 66 |    |
| TGC CAG CAG GCC CTG T.                                          |    |    |

2. Förfarande, som består av framställning av protein, vilket protein uppvisar human t-PA-funktion, särskilt förmår det katalysera konversionen av plasminogen till plasmin, det binder vid fibrin och klassas som t-PA på basen av immunologiska egenskaper, genom expression i en rekombinant-värdcell av protein kodande transformerbar DNA, k ä n n e t e c k n a t därav, att proteinet innehåller en allel eller ett derivat, som erhållits

genom aminosyradeletion, -substitution, -insertion, -addition eller -ersättning av nämnda 527 aminosyrasekvens enligt patentkravet 1.

- 5 3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c -  
k n a t därav, att en polypeptid produceras, som inte innefat-  
tarativ glykolysering av human vävnadsplasminogenaktivator.
4. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e -  
10 t e c k n a t därav, att värdcellen är en E.coli-stam.
5. Förfarande enligt patentkravet, k ä n n e t e c k n a t  
därav, att värdcellen är av däggdjursursprung.
- 15 6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t  
därav, att värdcellen är en äggstockscellinje av en kinesisk  
hamster.
7. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 6, k ä n n e -  
20 t e c k n a t därav, att det innefattar tillvaratagande och  
rengöring av proteinet.
8. Förfarande, som följer framställningen av protein med  
vävnadsplasminogenaktivatorfunktion enligt något av patentkra-  
25 ven 1 - 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att det innefattar  
användningen av nämnda protein vid framställning av farmaceu-  
tiska produkter.
9. DNA-isolat, som kodar nämnda protein, som är framställt  
30 enligt ett förfarande enligt kravet 1 eller 2.
10. Rekombinantkloningsvektor, som innehåller DNA, som kodar  
nämnda protein, som är framställt enligt ett förfarande enligt  
patentkravet 1 eller 2.

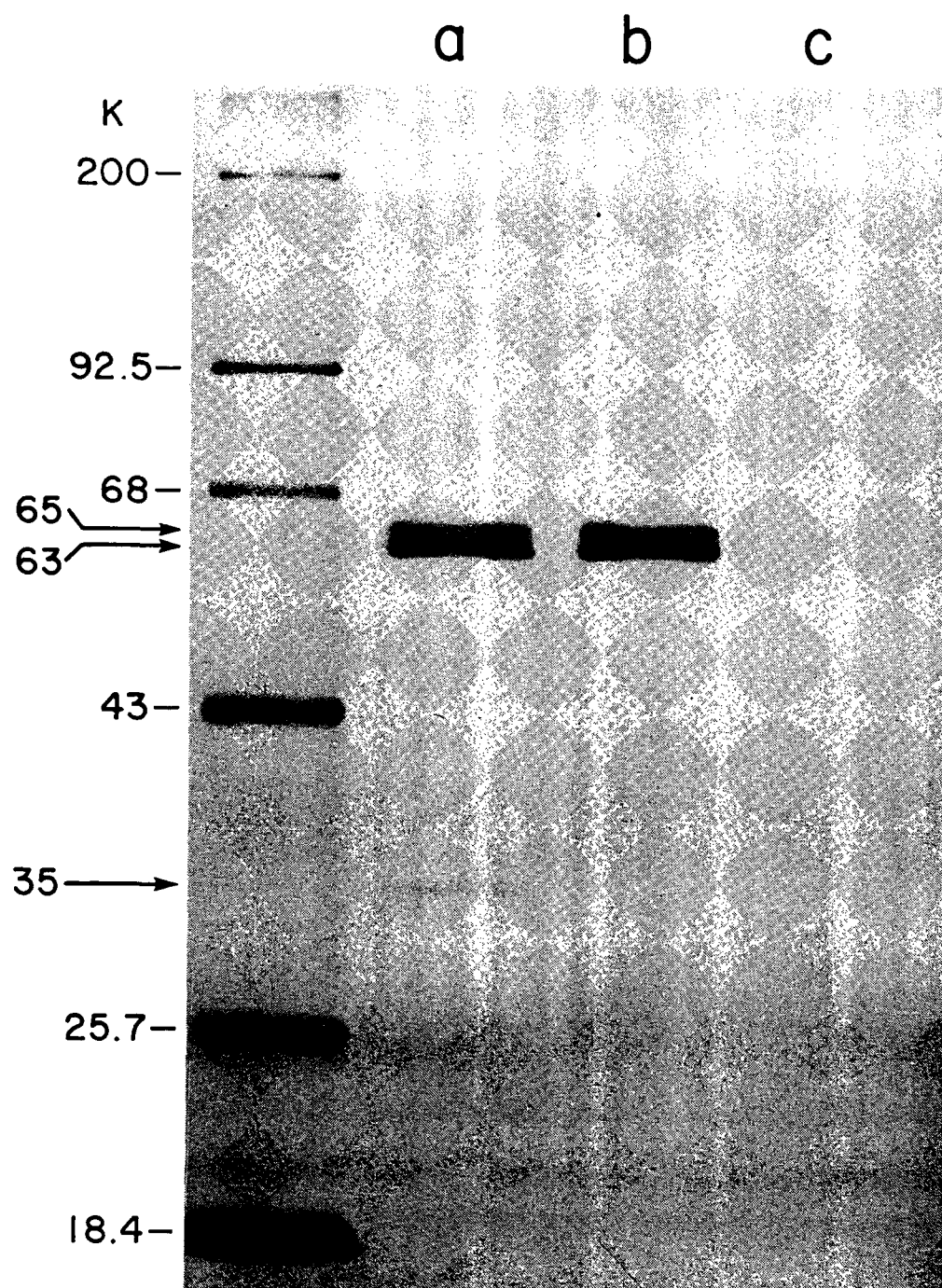
11. Rekombinantexpressionsvektor, som innehåller DNA, som kodar nämnda protein, som är framställt enligt ett förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, och som i en transformerad mikro-organism eller cellinje förmår expressera den kodande sekvensen för alstring av motsvarande polypeptid.

12. Mikro-organism eller cellkultur, som transfekterats med DNA, som kodar nämnda protein, som är framställd enligt ett förfarande enligt patentkravet 1 eller 2 och som förmår expressera det för alstring av nämnda protein.

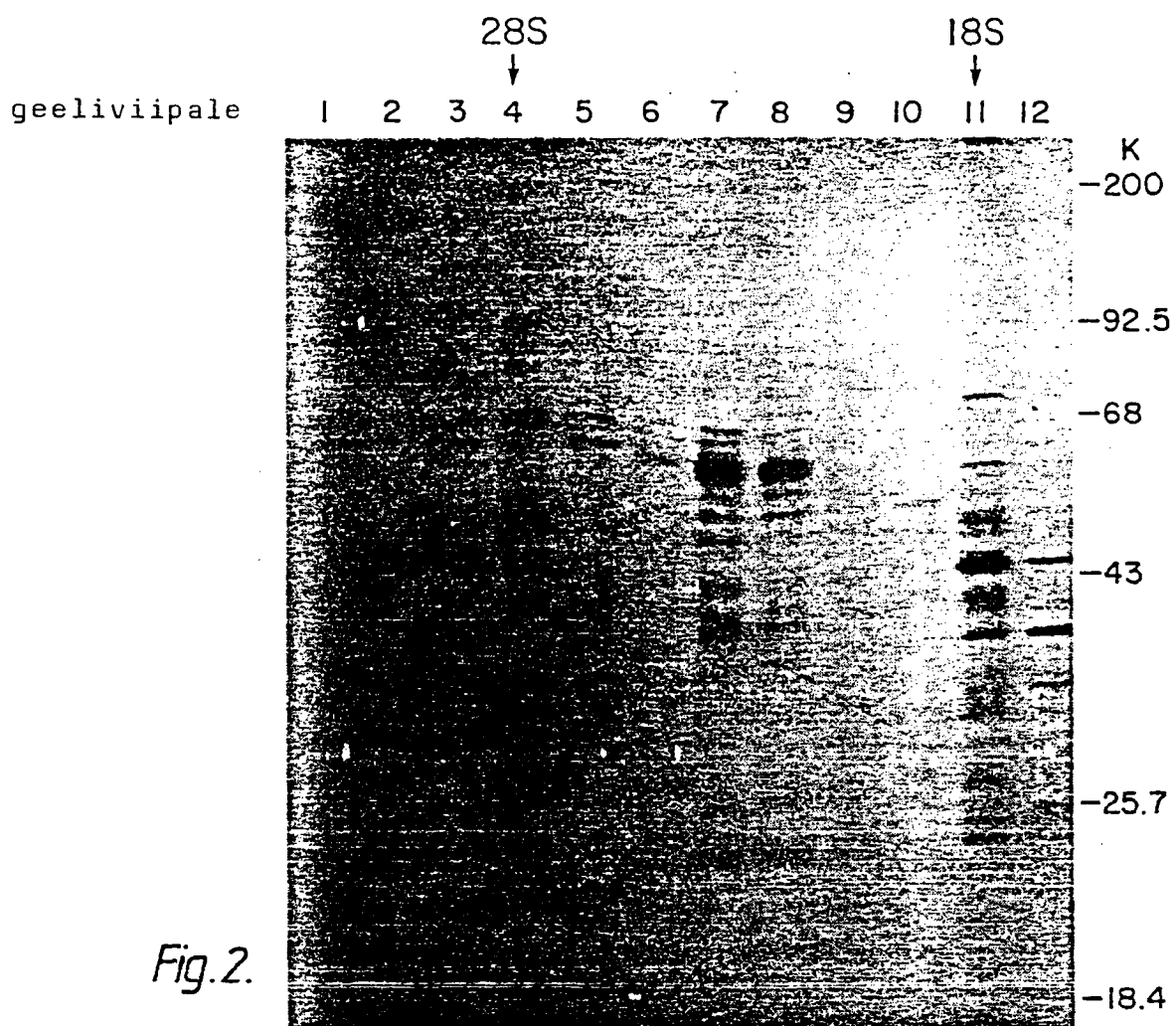
13. Mikro-organism enligt patentkravet 12, k ä n n e t e c k n a t därav, att den är en E.coli-stam.

14. Cellkultur enligt patentkravet 12, k ä n n e t e c k n a t därav, att den är en cellinje av ett däggdjur.

15. Cellkultur enligt patentkravet 14, k ä n n e t e c k n a t därav, att cellinjen är en cellinje av en kinesisk hamsters äggstockar.



*Fig.1.*



*Fig.2.*

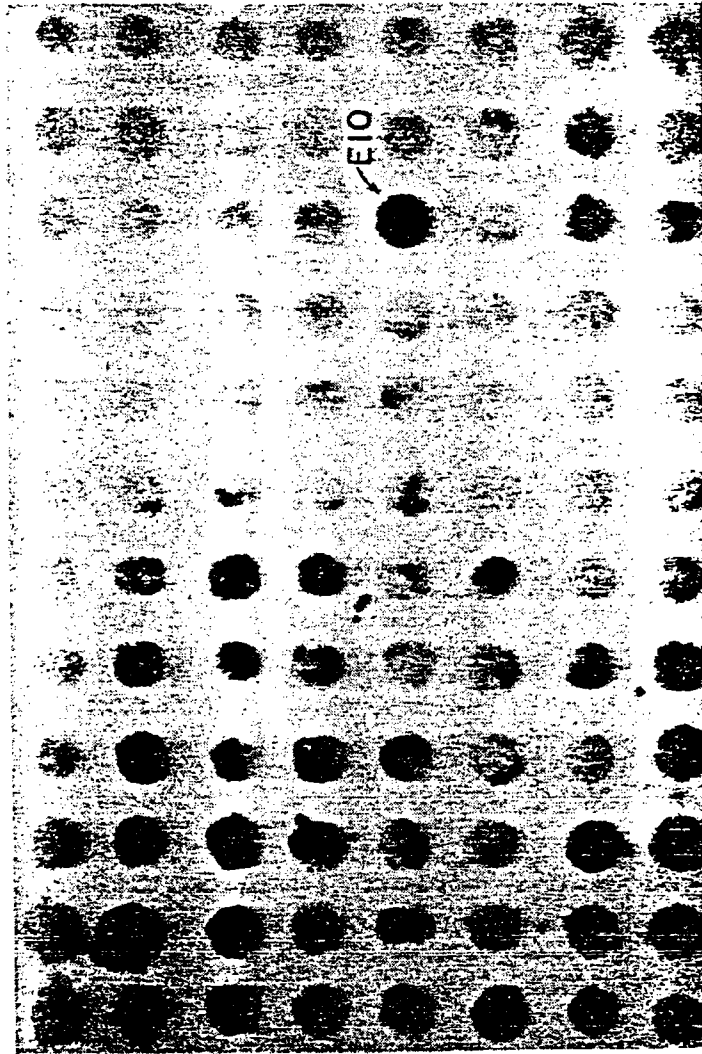
PESÄKKEEN HYBRIDISOINTI

RNA-geeliviipaleen 7 cDNA-kloonit

Fig. 3.

vs.

$^{32}\text{P}$ -TC(A)<sub>6</sub>CA(A)<sub>6</sub>TA( $\frac{9}{7}$ )TCCCA



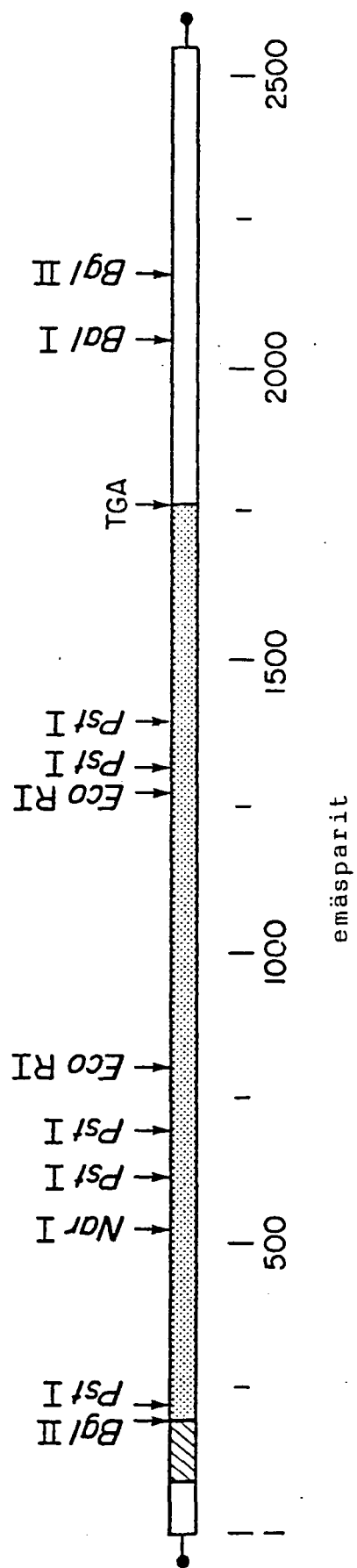


Fig. 4.

GTTCTGAGCACAGGGCTGGAGAGAAAACCTCTGCGAGGAAAGGGAAGGAGCAAGCCGTGA

|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|-----|--|--|--|--|--|--|
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | -35 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  | -30 |  |  |  |  |  |  |
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | met | asp | ala | met | lys | arg | gly | leu |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| ATTTAAGGGACGCTGTGAAGCAATGC |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | ATG | GAT | GCA | ATG | AAG | AGA | GGG | CTC |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | -20 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| cys                        | cys | val | leu | leu | leu | cys | gly | ala | val | phe | val | ser | pro | ser |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| TGC                        | TGT | GTG | CTG | CTG | CTG | TGT | GGA | GCA | GTC | TTC | GTT | TCG | CCC | AGC |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | -10 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  | 1   |  |  |  |  |  |  |
| gln                        | glu | ile | his | ala | arg | phe | arg | arg | gly | ala | arg | SER | TYR | GLN |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| CAG                        | GAA | ATC | CAT | GCC | CGA | TTC | AGA | AGA | GGA | GCC | AGA | TCT | TAC | CAA |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| VAL                        | ILE | CYS | ARG | ASP | GLU | LYS | THR | GLN | MET | ILE | TYR | GLN | GLN | HIS |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| GTG                        | ATC | TGC | AGA | GAT | GAA | AAA | ACG | CAG | ATG | ATA | TAC | CAG | CAA | CAT |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 20  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  | 30  |  |  |  |  |  |  |
| GLN                        | SER | TRP | LEU | ARG | PRO | VAL | LEU | ARG | SER | ASN | ARG | VAL | GLU | TYR |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| CAG                        | TCA | TGG | CTG | CGC | CCT | GTG | CTC | AGA | AGC | AAC | CGG | GTG | GAA | TAT |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| CYS                        | TRP | CYS | ASN | SER | GLY | ARG | ALA | GLN | CYS | HIS | SER | VAL | PRO | VAL |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| TGC                        | TGG | TGC | AAC | AGT | GGC | AGG | GCA | CAG | TGC | CAC | TCA | GTG | CCT | GTC |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 50  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  | 60  |  |  |  |  |  |  |
| LYS                        | SER | CYS | SER | GLU | PRO | ARG | CYS | PHE | ASN | GLY | GLY | THR | CYS | GLN |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| AAA                        | AGT | TGC | AGC | GAG | CCA | AGG | TGT | TTC | AAC | GGG | GGC | ACC | TGC | CAG |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| GLN                        | ALA | LEU | TYR | PHE | SER | ASP | PHE | VAL | CYS | GLN | CYS | PRO | GLU | GLY |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| CAG                        | GCC | CTG | TAC | TTC | TCA | GAT | TTC | GTG | TGC | CAG | TGC | CCC | GAA | GGA |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 80  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  | 90  |  |  |  |  |  |  |
| PHE                        | ALA | GLY | LYS | CYS | CYS | GLU | ILE | ASP | THR | ARG | ALA | THR | CYS | TYR |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| TTT                        | GCT | GGG | AAG | TGC | TGT | GAA | ATA | GAT | ACC | AGG | GCC | ACG | TGC | TAC |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| GLU                        | ASP | GLN | GLY | ILE | SER | TYR | ARG | GLY | THR | TRP | SER | THR | ALA | GLU |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| GAG                        | GAC | CAG | GGC | ATC | AGC | TAC | AGG | GGC | ACG | TGG | AGC | ACA | GCG | GAG |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  | 120 |  |  |  |  |  |  |
| SER                        | GLY | ALA | GLU | CYS | THR | ASN | TRP | ASN | SER | SER | ALA | LEU | ALA | GLN |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| AGT                        | GGC | GCC | GAG | TGC | ACC | AAC | TGG | AAC | AGC | AGC | GCG | TTG | GCC | CAG |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| LYS                        | PRO | TYR | SER | GLY | ARG | ARG | PRO | ASP | ALA | ILE | ARG | LEU | GLY | LEU |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| AAG                        | CCC | TAC | AGC | GGG | CGG | AGG | CCA | GAC | GCC | ATC | AGG | CTG | GGC | CTG |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  | 150 |  |  |  |  |  |  |
| GLY                        | ASN | HIS | ASN | TYR | CYS | ARG | ASN | PRO | ASP | ARG | ASP | SER | LYS | PRO |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| GGG                        | AAC | CAC | AAC | TAC | TGC | AGA | AAC | CCA | GAT | CGA | GAC | TCA | AAG | CCC |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| TRP                        | CYS | TYR | VAL | PHE | LYS | ALA | GLY | LYS | TYR | SER | SER | GLU | PHE | CYS |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| TGG                        | TGC | TAC | GTC | TTT | AAG | GCG | GGG | AAG | TAC | AGC | TCA | GAG | TTT | TGC |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
|                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  | 180 |  |  |  |  |  |  |
| SER                        | THR | PRO | ALA | CYS | SER | GLU | GLY | ASN | SER | ASP | CYS | TYR | PHE | GLY |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |
| AGC                        | ACC | CCT | GCC | TGC | TCT | GAG | GGA | AAC | AGT | GAC | TGC | TAC | TTT | GGG |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |  |

*Fig. 5A.*

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ASN | GLY | SER | ALA | TYR | ARG | GLY | THR | HIS | SER | LEU | THR | GLU | SER | GLY | AAT | GGG | TCA | GCC | TAC | CGT | GGC | ACG | CAC | AGC | CTC | ACC | GAG | TCG | GGT |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ALA | SER | CYS | LEU | PRO | TRP | ASN | SER | MET | ILE | LEU | ILE | GLY | LYS | VAL | GCC | TCC | TGC | CTC | CCG | TGG | AAT | TCC | ATG | ATC | CTG | ATA | GGC | AAG | GTT |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| TYR | THR | ALA | GLN | ASN | PRO | SER | ALA | GLN | ALA | LEU | GLY | LEU | GLY | LYS | TAC | ACA | GCA | CAG | AAC | CCC | AGT | GCC | CAG | GCA | CTG | GGC | CTG | GGC | AAA |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| HIS | ASN | TYR | CYS | ARG | ASN | PRO | ASP | GLY | ASP | ALA | LYS | PRO | TRP | CYS | CAT | AAT | TAC | TGC | CGG | AAT | CCT | GAT | GGG | GAT | GCC | AAG | CCC | TGG | TGC |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| HIS | VAL | LEU | LYS | ASN | ARG | ARG | LEU | THR | TRP | GLU | TYR | CYS | ASP | VAL | CAC | GTG | CTG | AAG | AAC | CGC | AGG | CTG | ACG | TGG | GAG | TAC | TGT | GAT | GTG |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 260 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| PRO | SER | CYS | SER | THR | CYS | GLY | LEU | ARG | GLN | TYR | SER | GLN | PRO | GLN | CCC | TCC | TGC | TCC | ACC | TGC | GGC | CTG | AGA | CAG | TAC | AGC | CAG | CCT | CAG |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| PHE | ARG | ILE | LYS | GLY | GLY | LEU | PHE | ALA | ASP | ILE | ALA | SER | HIS | PRO | TTT | CGC | ATC | AAA | GGA | GGG | CTC | TTC | GCC | GAC | ATC | GCC | TCC | CAC | CCC |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 290 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| TRP | GLN | ALA | ALA | ILE | PHE | ALA | LYS | HIS | ARG | ARG | SER | PRO | GLY | GLU | TGG | CAG | GCT | GCC | ATC | TTT | GCC | AAG | CAC | AGG | AGG | TCG | CCC | GGA | GAG |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ARG | PHE | LEU | CYS | GLY | GLY | ILE | LEU | ILE | SER | SER | CYS | TRP | ILE | LEU | CGG | TTC | CTG | TGC | GGG | GGC | ATA | CTC | ATC | AGC | TCC | TGC | TGG | ATT | CTC |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 320 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| SER | ALA | ALA | HIS | CYS | PHE | GLN | GLU | ARG | PHE | PRO | PRO | HIS | HIS | LEU | TCT | GCC | GCC | CAC | TGC | TTC | CAG | GAG | AGG | TTT | CCG | CCC | CAC | CAC | CTG |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 340 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| THR | VAL | ILE | LEU | GLY | ARG | THR | TYR | ARG | VAL | VAL | PRO | GLY | GLU | GLU | ACG | GTG | ATC | TTG | GGC | AGA | ACA | TAC | CGG | GTG | GTC | CCT | GGC | GAG | GAG |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 350 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| GLU | GLN | LYS | PHE | GLU | VAL | GLU | LYS | TYR | ILE | VAL | HIS | LYS | GLU | PHE | GAG | CAG | AAA | TTT | GAA | GTC | GAA | AAA | TAC | ATT | GTC | CAT | AAG | GAA | TTC |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 370 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ASP | ASP | ASP | THR | TYR | ASP | ASN | ASP | ILE | ALA | LEU | LEU | GLN | LEU | LYS | GAT | GAT | GAC | ACT | TAC | GAC | AAT | GAC | ATT | GCG | CTG | CTG | CAG | CTG | AAA |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| SER | ASP | SER | SER | ARG | CYS | ALA | GLN | GLU | SER | SER | VAL | VAL | ARG | THR | TCG | GAT | TCG | TCC | CGC | TGT | GCC | CAG | GAG | AGC | AGC | GTG | GTC | CGC | ACT |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 400 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| VAL | CYS | LEU | PRO | PRO | ALA | ASP | LEU | GLN | LEU | PRO | ASP | TRP | THR | GLU | GTG | TGC | CTT | CCC | CCG | GCG | GAC | CTG | CAG | CTG | CCG | GAC | TGG | ACG | GAG |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| CYS | GLU | LEU | SER | GLY | TYR | GLY | LYS | HIS | GLU | ALA | LEU | SER | PRO | PHE | TGT | GAG | CTC | TCC | GGC | TAC | GGC | AAG | CAT | GAG | GCC | TTG | TCT | CCT | TTC |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 420 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

*Fig. 5B.*

430  
 TYR SER GLU ARG LEU LYS GLU ALA HIS VAL ARG LEU TYR PRO SER  
 TAT TCG GAG CGG CTG AAG GAG GCT CAT GTC AGA CTG TAC CCA TCC

440 450  
 SER ARG CYS THR SER GLN HIS LEU LEU ASN ARG THR VAL THR ASP  
 AGC CGC TGC ACA TCA CAA CAT TTA CTT AAC AGA ACA GTC ACC GAC

460  
 ASN MET LEU CYS ALA GLY ASP THR ARG SER GLY GLY PRO GLN ALA  
 AAC ATG CTG TGT GCT GGA GAC ACT CGG AGC GGC GGG CCC CAG GCA

470 480  
 ASN LEU HIS ASP ALA CYS GLN GLY ASP SER GLY GLY PRO LEU VAL  
 AAC TTG CAC GAC GCC TGC CAG GGC GAT TCG GGA GGC CCC CTG GTG

490  
 CYS LEU ASN ASP GLY ARG MET THR LEU VAL GLY ILE ILE SER TRP  
 TGT CTG AAC GAT GGC CGC ATG ACT TTG GTG GGC ATC ATC AGC TGG

500 510  
 GLY LEU GLY CYS GLY GLN LYS ASP VAL PRO GLY VAL TYR THR LYS  
 GGC CTG GGC TGT GGA CAG AAG GAT GTC CCG GGT GTG TAC ACA AAG

520 527  
 VAL THR ASN TYR LEU ASP TRP ILE ARG ASP ASN MET ARG PRO OP  
 GTT ACC AAC TAC CTA GAC TGG ATT CGT GAC AAC ATG CGA CCG TGA

CCAGGAACACCCGACTCCTCAAAAGCAAATGAGATCCCGCCTCTTCTTCTTCAGAAGACA  
 CTGCAAAGGCGCAGTGCTTCTCTACAGACTTCTCCAGACCCACCACACCGCAGAAGCGGG  
 ACGAGACCCTACAGGGAGAGGGAAGAGTGCATTTTCCAGATACTTCCCATTTTGGAAGT  
 TTTCAGGACTTGGTCTGATTTTCAGGATACTCTGTCAGATGGGAAGACATGAATGCACACT  
 AGCCTCTCCAGGAATGCCTCCTCCCTGGGCAGAAGTGGCCATGCCACCCTGTTTTGCTA  
 AAGCCCAACCTCCTGACCTGTCAACGTGAGCAGCTTTGGAAACAGGACCACAAAATGAA  
 AGCATGTCTCAATAGTAAAAGAAACAAGAGATCTTTTCAGGAAAGACGGATTGCATTAGAA  
 ATAGACAGTATATTTATAGTCACAAGGGCCAGCAGGGCTCAAAGTTGGGGCAGGCTGGC  
 TGGCCCGTCATGTTCTCAAAAGCGCCCTTGACGTCAAGTCTCCTTCCCCTTTCCCCTACT  
 CCCTGGCTCTCAGAAGGTATTCTTTTGTAGTACAGTGTGTAAAGTGTAATCCTTTTTCT  
 TTATAAACTTTAGAGTAGCATGAGAGAATTGTATCATTGAACTAGGCTTCAGCATA  
 TTTATAGCGATCCATCGTTAGTTTTTACTTTCCGTTGCCACAACCCTGTTTTATACCGTA  
 CTTAATAAATTTCGGATATATTTTTTTCACAGTTTTTTTCCAAAAA

*Fig. 5C.*

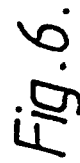
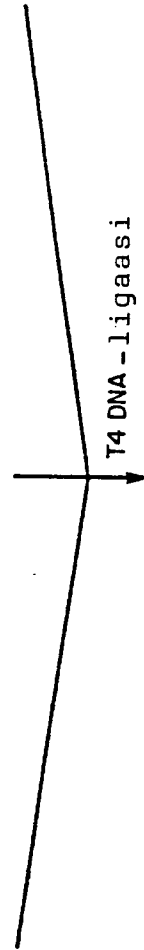
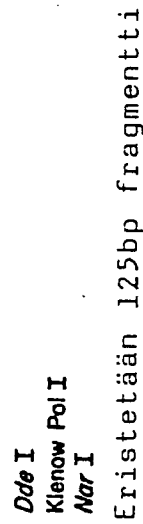
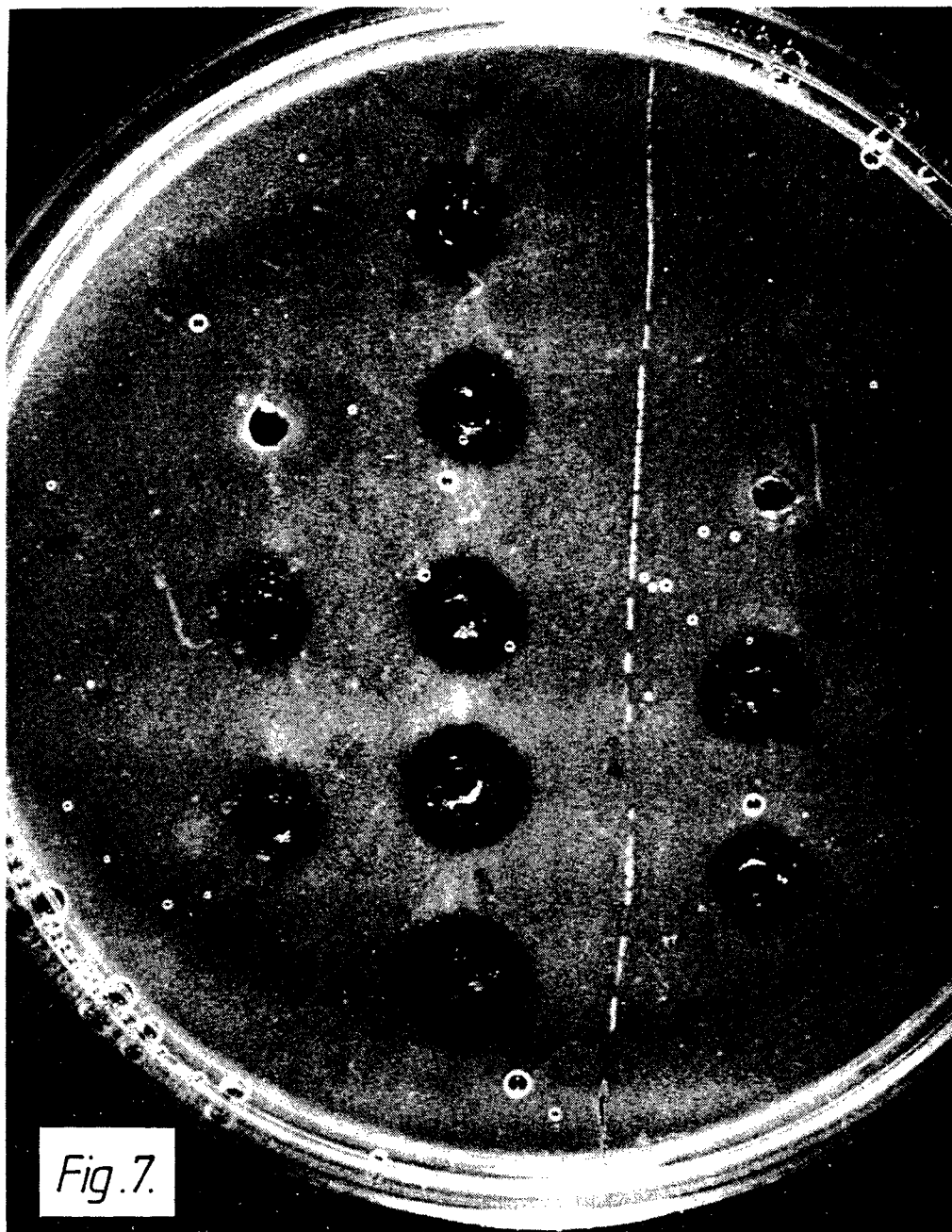


Fig. 6.



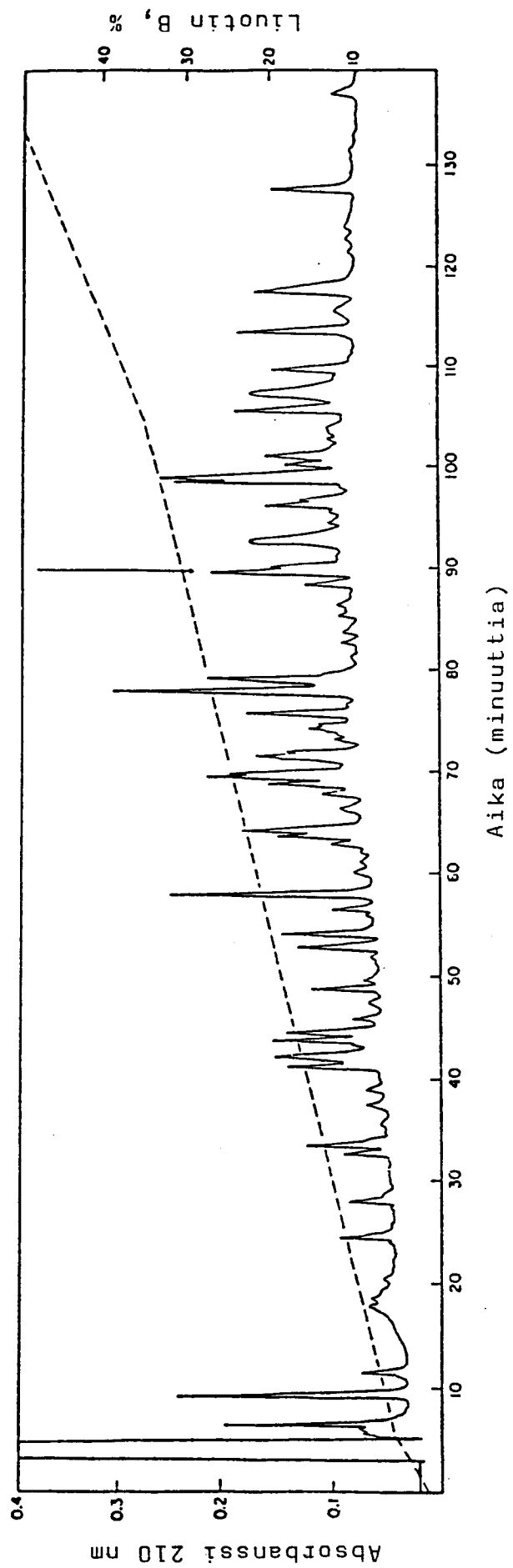


Fig. 8.

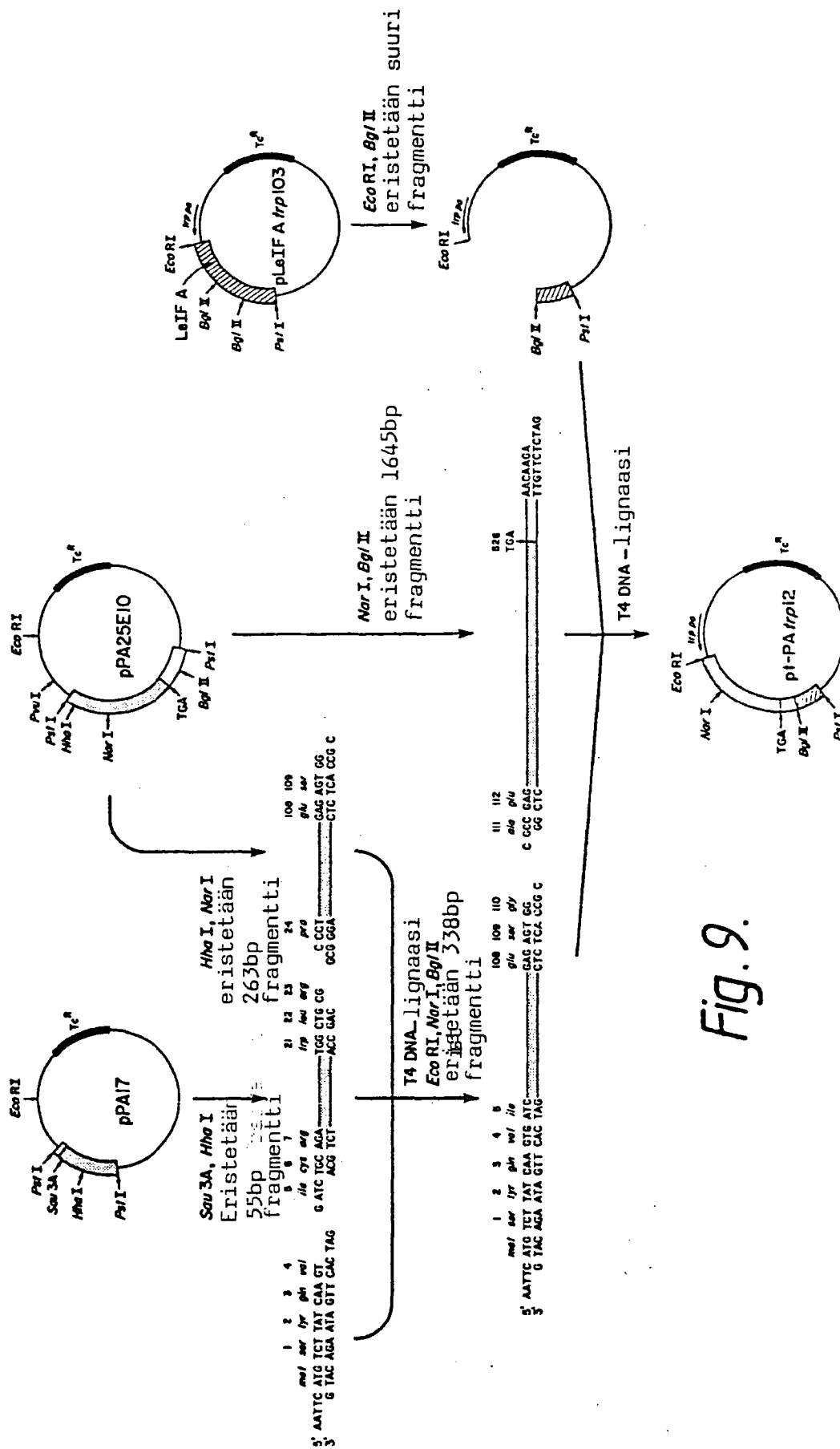
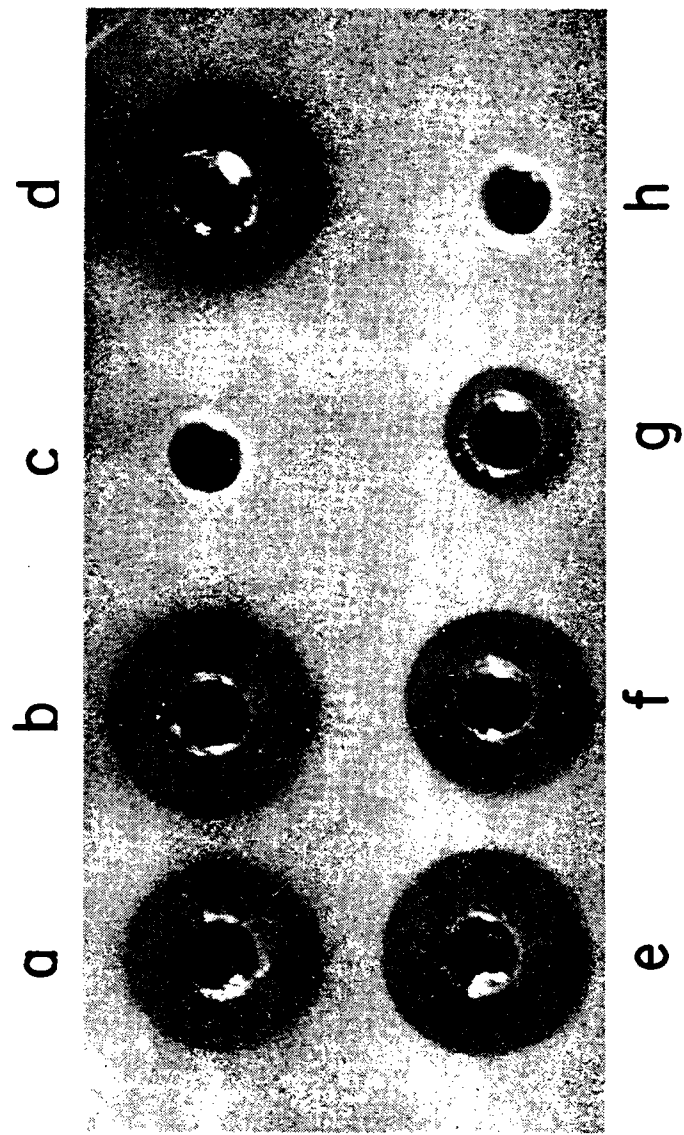
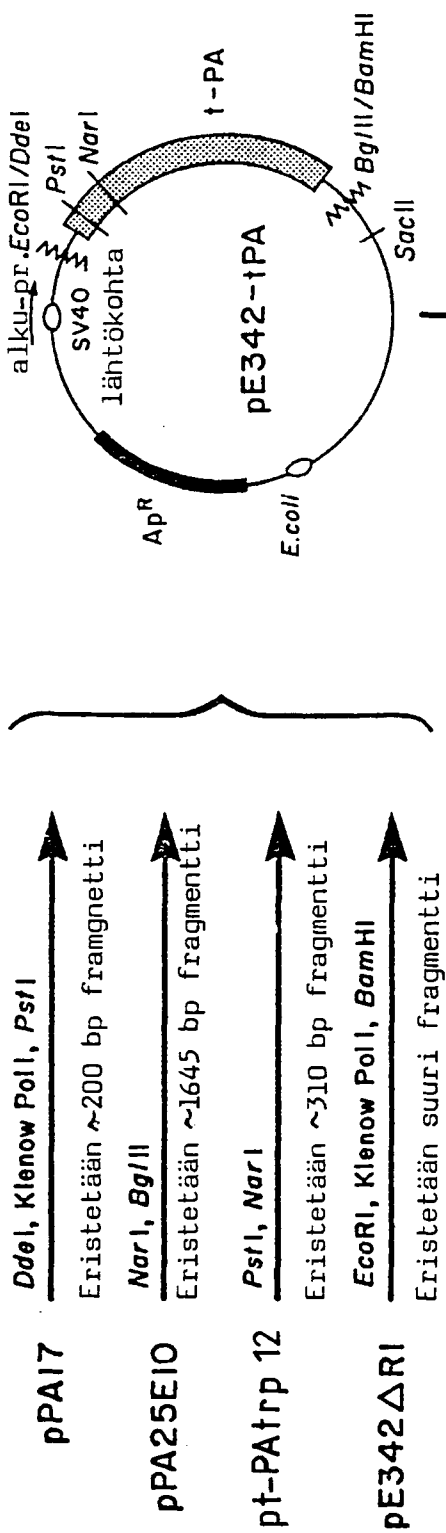


Fig. 9.

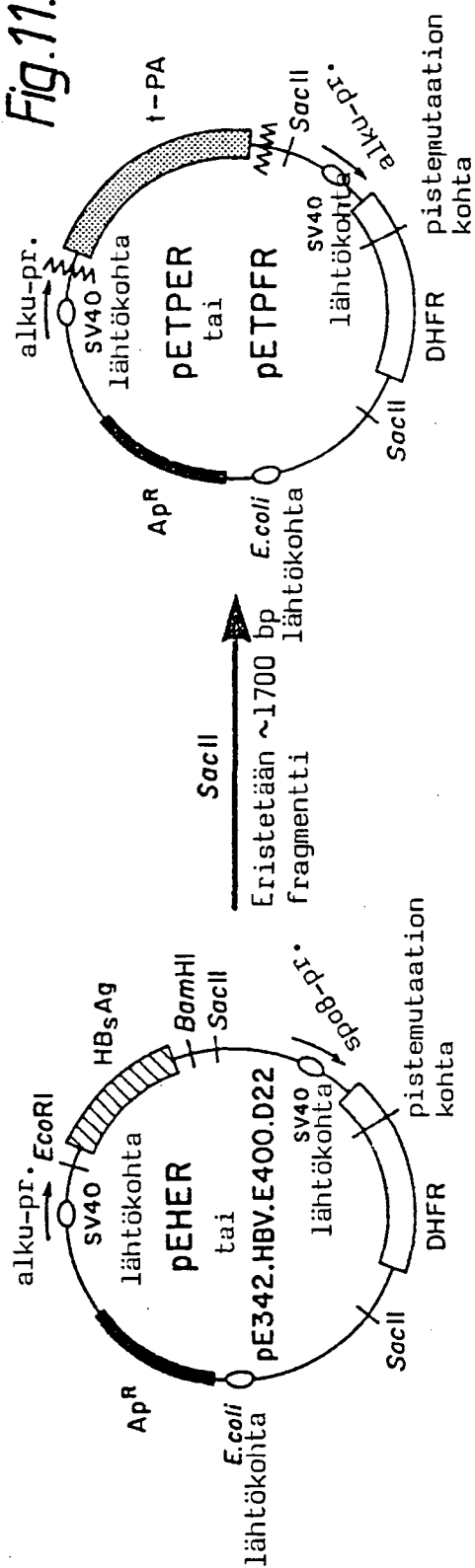


*Fig. 10.*



*SacII*  
 Bakteriperäinen  
 Alkalinen  
 Fosfataasi

Fig.11.



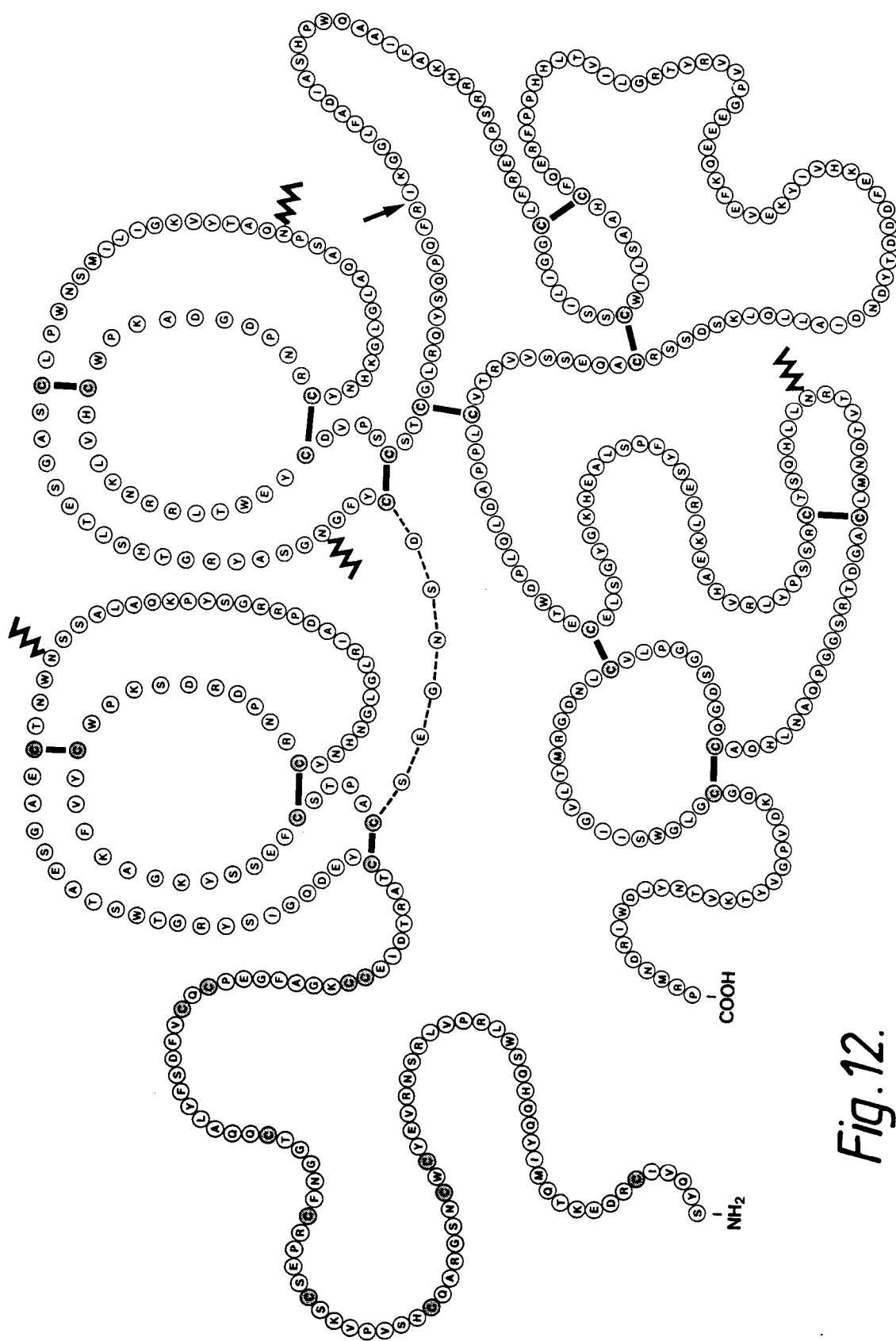


Fig.12.