



NORGE

(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **308708**

(13) **B1**

(51) Int Cl⁷ C 12 N 9/64, 15/58, 1/21, A 61 K 38/48

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19913129	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	1991.08.12	søknadsnummer	1990.02.13, PCT/EP90/00242
(24) Løpedag	1990.02.13	(85) Videreføringsdag	1991.08.12
(41) Alm. tilgj.	1991.10.11	(30) Prioritet	1989.02.13, DE, 3904580
(45) Meddelt dato	2000.10.16		1989.05.30, DE, 3917949

(71) Patenthaver	Schering AG, D-13342 Berlin, DE
(72) Oppfinner	Berthold Baldus, Berlin, DE
	Peter Donner, Berlin, DE
	Wolf-Dieter Schleuning, Berlin, DE
	Alejandro Alagon, Morelos, MX
	Werner Boidol, Berlin, DE
	Jörn Reiner Krätzschmar, Berlin, DE
	Bernard Jacques Haendler, Berlin, DE
	Gernot Langer, Berlin, DE
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, 0306 Oslo

(54) Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av et trombolytisk protein, samt isolert DNA, mikroorganisme og fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat
-----------------	--

(56) Anførte publikasjoner	NO 892976 Blood, vol. 43, 3. Mars 1974, s. 317-326
----------------------------	---

(57) Sammendrag	Nye trombolytiske v-PA som løser opp blodkoageler i menneskekroppen og således er anvendbare for behandling av f.eks. hjerteinfarkt.
-----------------	--

Foreliggende oppfinnelse gjelder en fremgangsmåte for fremstilling av et trombolytisk protein, samt isolert DNA, mikroorganisme og fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat.

5 Tromboser forårsakes av dannelse av blodkoageler i blodkar. En skiller mellom venetromboser som inkluderer lungeembolier, og arterielle tromboser som inkluderer akutt myokardielt infarkt.

10 Lungeemboli og hjerteinfarkt er livstruende hendelser som krever umiddelbar medisinsk intervensjon.

I tillegg til en rekke invasive metoder er det i de senere år blitt utviklet en populær form for terapi av arterielle og venøse tromboser i form av enzymatisk trombolysis med plasminogenaktivatorer. Disse stoffer, såkalte trombolytiske stoffer, omdanner plasminogen, det inaktive proenzym i det fibrinolytiske system i blodet, til det aktive proteolytiske enzym plasmin. Plasmin vil i sin tur oppløse det fibrøse stoff fibrin, som er en viktig komponent i et blodkoagel. Dette fører til at blokkerte blodkar gjenåpnes og at blodstrømmen gjenopprettes. Men plasmin er en relativt uspesifikk protease. Når den først er dannet i blodet, vil den ved proteolyse ødelegge blodkomponenter som er uunnværlige for intakt hemostase (f.eks. fibrinogen) og ved dette forårsake stor fare for forblødning under visse omstendigheter.

25 Første generasjons trombolytiske stoffer, streptokinase og urokinase, er stoffer som vil omdanne plasminogen til plasmin i hele kroppen og indusere en omfattende proteolyse når de først er injisert inn i blodsirkulasjonen. Trombolyseterapi med disse stoffer er derfor ofte fulgt av komplikasjoner grunnet blødning. En antok at den senere utviklede fibrinspesifikke trombolysis, hvor gjenforente plasminogenaktivatorer av vevstypen t-PA benyttes, ville føre ut av dette dilemma. I blodsirkulasjonen har t-PA bare lav affinitet overfor plasminogen. I nærvær av det fibrøse stoff fibrin, som t-PA reagerer med via spesifikke bindingssteder, fås en flere gangers økning av denne affinitet. Dette fører til plasmindannelse på overflaten av tromben. Et slikt forløp har blitt verifisert *in vitro* og i dyrestudier, mens kliniske studier

derimot viser at store mengder av t-PA kreves for å gi en rask oppløsning av en koronar trombose.

Infusjon av så store doser av t-PA vil imidlertid føre til systemisk proteolyse, fulgt av en relativ fare for blødning, på tilsvarende måte som når streptokinase og urokinase benyttes. Det tales derfor i dag om t-PAs relative fibrinspesifisitet. Årsaken til dette ligger i en essensiell egenskap ved t-PA: Dette molekyl er en aktiv protease som under gunstige forhold (høy enzymkonsentrasjon, lange eksponeringstider, høy substratkonsentrasjon, optimal pH og ionebetingelser) vil omdanne plasminogen til plasmin selv i fravær av fibrin. Alle disse betingelser oppfylles i våre dagers kliniske standardterapi med t-PA.

Leting etter mer spesifikke plasminogenaktivatorer som oppfyller kriteriet om fibrinspesifisitet førte til at v-PA, et nytt, naturlig forekommende stoff med fibrinolytisk aktivitet, ble funnet.

Oppfinnelsen gjelder fremstilling av det trombolytisk aktive stoff v-PA fra spytt fra flaggermus av slekten *Desmodus spec.*, som har følgende karakteristiske egenskaper:

- fire forskjellige cDNA som koder for fire forskjellige v-PA-proteiner ble funnet i et spyttkjertel-cDNA-bibliotek:

(1) v-PA α_1 : høymolekylær form som består av et fingerdomene, et EGF (epidermal vekstfaktor) domene, et kringledomene og et proteasedomene (eksempel 18).

(2) v-PA α_2 : høymolekylær form med de samme domener som v-PA α_1 , men forskjellig fra v-PA α_1 i nukleotidsekvens så vel som i aminosyresekvens.

(3) v-PA β : molekylær form som består av et EGF-domene, et kringledomene og et proteasedomene (eksempel 18).

(4) v-PA γ : lavmolekylær form som består av et kringledomene og et proteasedomene.

Det aktive stoff v-PA α_1 gir ved natriumdodecylsulfatgelelektroforese under ikke-reduserende betingelser et hovedproteinbånd med en molekylvekt på 43000 ± 2000 (eksempel 2).

Det aktive stoff v-PA β gir ved natriumdodecyl-sulfatgelelektroforese under ikke-reduserende betingelser et hovedproteinbånd med en molekylvekt på 39000 ± 3000 , og under reduserende betingelser på 43000 ± 2000 (eksempel 1).

5 Det aktive stoff v-PA β elueres fra en gelfiltreringskolonne ("Superose" 12) med en molekylvekt på 40000 ± 3000 (eksempel 1).

De isoelektriske punkt (pI) til det aktive stoff v-PA β ligger mellom 6,8 og 8,5.

10 Det aktive stoff reagerer med ^3H -diisopropylfluorofosfat og er således en serinprotease (eksempel 9).

De aktive stoffer v-PA α_1 og v-PA β hydrolyserer de kromogene peptider S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA) og S-2444 (< Glu-Gly-Arg-pNA), men ikke det kromogene peptid S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA) (eksempel 16).

15 Det aktive stoff bindes ikke til lysin-"Sephrose" i pH-området 4-10,5 (eksempel 14).

De aktive stoffer v-PA α_1 og v-PA β danner lyseringer på fibrinplater, men ikke på kaseinplater (eksempel 20 15).

De aktive stoffer v-PA α_1 og v-PA β bindes til Zn^{++} -chelatisert "Sephrose" ved pH 7,5 (eksempel 1 og 2).

Det aktive stoff v-PA β aktiverer plasminogen bare i nærvær av stimulatorer som fibrin, men ikke i nærvær av fibrinogen (eksempel 7).

Det aktive stoff v-PA β følger ikke klassisk Michaelis-Menten-kinetikk når plasminogen omvandles til plasmin i nærvær av fibrinmonomerer; v-PA β er et enzym med allosteriske egenskaper (eksempel 12).

30 Det aktive stoff gir en konsentrasjonsavhengig lyse *in vitro* av tromber fra humant helblod (eksempel 8).

Det aktive stoff v-PA β gir ikke, i motsetning til t-PA, målbar fibrinogennedbrytning i et rekonstituert, koagulerbart *in vitro*-system (eksempel 10).

35 Det aktive stoff gir en konsentrasjonsavhengig fibrinolyse i en *in vitro*-fibrinolysetest (International Clot-Lysis Assay) (eksempel 13).

De aktive stoffer v-PA α_1 og v-PA β bindes til heparin-"Sephrose", og kan elueres med egnede løsninger (eksempel 4).

5 Det aktive stoff bindes til immobilisert inhibitor som er isolert fra frø fra forskjellige *Erythrina*-arter og kan elueres fra denne med egnede løsninger (eksempel 3).

De aktive stoffer v-PA α_1 og v-PA β bindes til fibrin-"Celite" og kan elueres med egnede metoder (eksempel 5).

10 Det aktive stoff bindes til hydroksyapatitt under visse betingelser og kan elueres med en fosfatholdig buffer (eksempel 2).

De aktive stoffer v-PA α_1 og v-PA β kan skilles fra hverandre og isoleres ved egnede metoder (eksempel 2, 4 og 5).

15 De aktive stoffer v-PA α_1 og v-PA β er forskjellig fra hverandre med hensyn til N-terminal aminosyresekvens (eksempel 6).

De aktive stoffer v-PA α_1 og v-PA β er forskjellig fra hverandre med hensyn til aminosyre- og nukleotidsekvens (eksempel 18).

20 Den kodende sekvens for de aktive stoffer kan inkorporeres i en tilsvarende vektor "septan". Disse uttrykker det aktive stoff i egnede eukaryote celledsystemer (eksempel 19).

25 Det trombolytisk aktive stoff v-PA representerer en ny, naturlig forekommende plasminogenaktivator som løser opp blodkoageler i menneskekroppen, og som derfor er anvendelig for behandling av f.eks. hjerteinfarkt.

Dette stoff finnes i spytt fra alle flaggermusarter av slekten *Desmodus spec.* i lav konsentrasjon og uttrykkes sannsynligvis i spyttkjertelceller i denne type dyr. Flaggermus av slekten *Desmodus spec.* omfatter alle flaggermus på det amerikanske kontinent. Slekten *Desmodus* fra Sentral-Amerika og Mexico har vært gjenstand for spesielt grundige undersøkelser.

35 Ved foreliggende oppfinnelse er det således tilveiebrakt en fremgangsmåte for fremstilling av et i det vesentlige rent protein som er trombolytisk, aktiverer plasminogen i nærvær av fibrin, men i det vesentlige ikke i nærvær av fibrinogen, og er allosterisk, hvor proteinet er et

v-PA α_1 med aminosyresekvensen ifølge figur 26a, omfattende uttrykking av DNA som koder for v-PA α_1 , i mikroorganismen ifølge krav 3, kjennetegnet ved at v-PA α_1 kromatograferes på en kolonne, det aktive v-PA elueres kvantitativt etter vasking av kolonnen, de oppsamlede fraksjoner gelfiltreres i fravær av salter, og gelfiltreres deretter nok en gang i nærvær av en fysiologisk saltoppløsning. Videre er det tilveiebrakt isolert DNA som er kjennetegnet ved at det koder for et protein fremstilt ifølge krav 1 og har nukleotidsekvensen ifølge figur 26a, og mikroorganisme som er kjennetegnet ved at den er transformert med en vektor som omfatter DNA ifølge krav 2, og er i stand til å uttrykke det gitte genet. De detaljerte fremgangsmåteparametere blir beskrevet i eksempel 1.

Foreliggende oppfinnelse gjelder videre en fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat, kjennetegnet ved at en forbindelse fremstilt ifølge hvilket som helst av kravene 1, 4 og 5, blandes med vanlige hjelpestoffer og eksipienser, slik som for eksempel gummi arabicum, talkum, stivelse, mannitol, metyl-cellulose, laktose, slike overflateaktive midler som Tween eller Myrj, magnesiumstearat, vandige eller ikke-vandige bærere, parafinderivater, fukte-, dispergerings-, emulgerings- og konserveringsmidler, og smaksstoffer for å regulere smaken, for eksempel eteriske oljer.

Fordelene med det nye trombolytiske stoff v-PA sammenlignet med t-PA kan utledes fra eksempel 7, 8, 10 og 15, som beskrives nedenfor.

Med vesentlig rent menes at et protein er renset, f.eks. til en grad hvor dets aktivitet er vesentlig høyere enn den til proteinet i naturen. Fortrinnsvis vil proteinet være renset til homogenitet, helst minst 90 % rent, aller helst 95 % rent eller mer.

DNA-sekvensene ifølge foreliggende oppfinnelse kan rutinemessig settes inn i vanlige, f.eks. kommersielt tilgjengelige, vektorer som plasmider, fager o.l. som er anvendelige for ekspresjon i f.eks. de vanlige, f.eks. kommersielt tilgjengelige cellelinjer.

Oligonukleotidprober spesifikke for v-PA-sekvenser kan oppbygges rutinemessig ved å velge sekvenser i leder-regionen eller i den komplette sekvens som er forskjellig fra t-PA (se sammenligning i figur 27).

5

```

vPA-β 141 CTGTTGTGTGTACTGCTGCTTTGTGGAGCAGTCTTCTCGTTGCCCAGGCA 190
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
t-PA   98 CTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCTGTTTCGCCAGCCA 147

10 vPAβ 191 GGAAACCTACAGGCAATTGGCAAGGG 216
    ||||| | | | | | | | | | | | | | | | |
t-PA 148 GGAAATCCATGCCCGATTGAGAAGAG 173

```

Vist ovenfor er DNA-sekvensen til proben benyttet til screening av cDNA-biblioteket, fått fra klon vPA_β ved oppslutning med restriksjonsendonukleasene BamHI og AluI (vPA_β) og den tilsvarende sekvens fra en t-PA cDNA-klon (t-PA).

Antistoffer kan også fremstilles rutinemessig ved normale fremgangsmåter, f.eks. ved å produsere dem i dyr som geiter.

v-PA fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse kan gis til pattedyr inklusive mennesker på samme måte som t-PA, men med færre bivirkninger, på grunn av v-PAs selektivitet som diskutert ovenfor. Generelt kan doser mindre enn de som trengs av t-PA benyttes. Anvendbare aktiviteter kan rutinemessig bestemmes ved å benytte konvensjonelle fremgangsmåter. Typiske indikasjoner inkluderer de for hvilke trombolytiske stoffer er anvendelige, f.eks. hjerteinfarkt, slag, arteriell trombose osv. De vanlige galeniske tilsetningsstoffer kan benyttes for å fremstille farmasøytiske preparater.

Eksempel 1

Bearbeiding av en 60 ml porsjon med spytt fra vampyrflagger-
musen *Desmodus rotundus* som i det vesentlige inneholder den
molekylære form av v-PA β

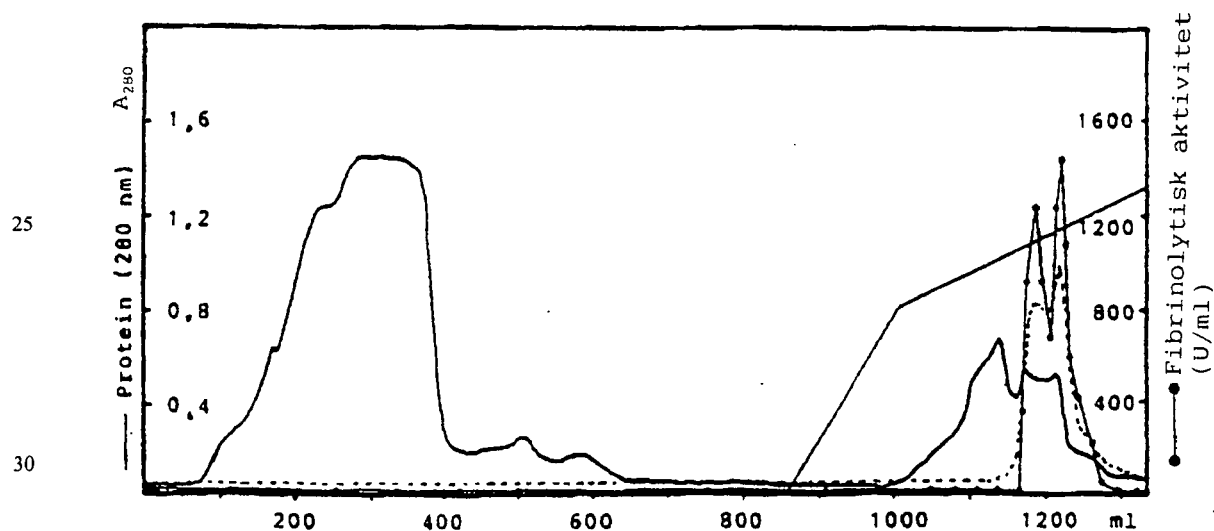
5

(a) Zn⁺⁺-chelate-"Sephacrose"-kromatografi

60 ml spytt sentrifugeres ved 4 °C ved 6000 x g.
Supernatanten justeres til 20 mM tris, pH 7,5, 100 mM NaCl,
0,01 % "Pluronic" F 68 og appliseres på en kromatografikolonne
10 fylt med 200 ml chelat-"Sephacrose" "fast flow" og ekvilibrert
med 10 mM tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM imidazol og 0,01 %
"Pluronic" F 68. Kolonnen vaskes med denne buffer til absor-
bansen målt ved 280 nm har nådd basislinjen (tilnærmet 600
ml). Deretter elueres v-PA med en gradient fra 1 til 50 mM
15 imidazol (1000 ml) i 10 mM tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,01 %
"Pluronic" F 68 (figur 1). Dette rensetrinn utføres ved 4 °C.

Amidolytisk aktivitet

20

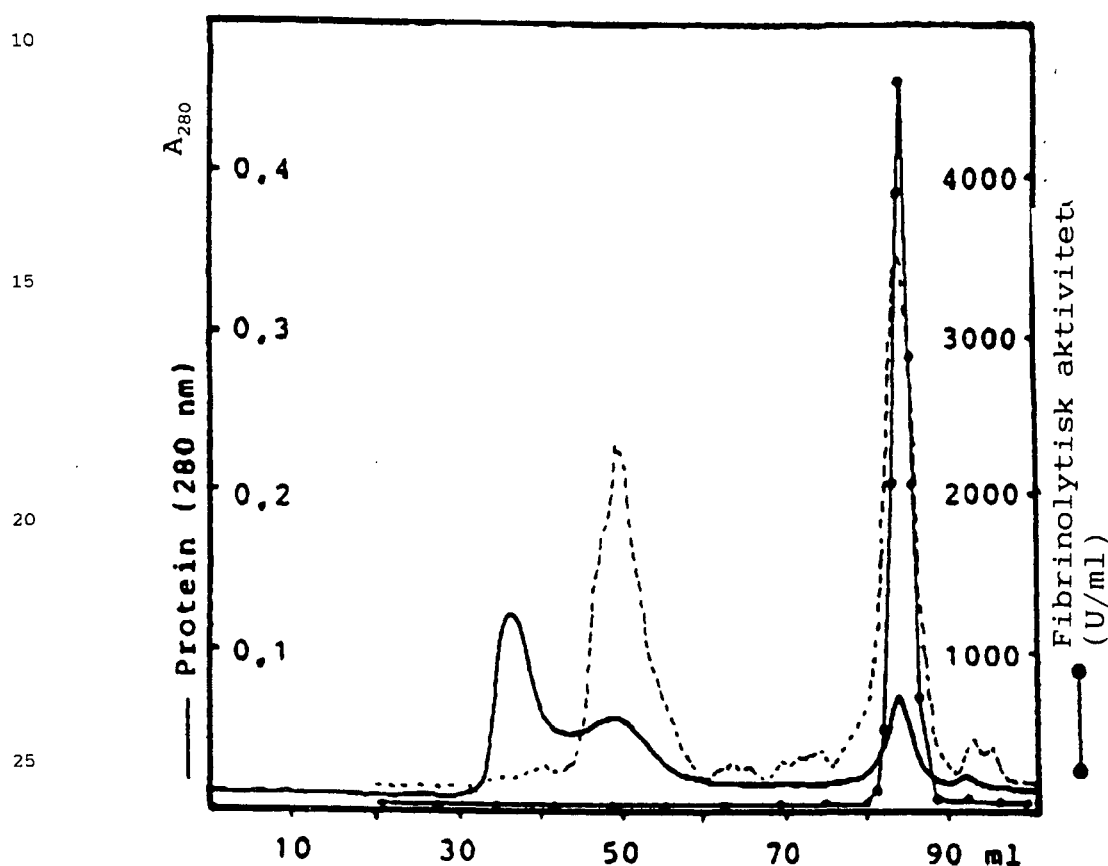


35

(b) Gelfiltrering uten NaCl

5 ml av en v-PA-holdig fraksjon fra Zn⁺⁺-chelatat "Sephacrose"-kromatografi blir fraksjonert på en "Superose" 12 HR 16/50 kromatografikolonne (Pharmacia) i 20 mM tris, pH 8,0, 0,01 % "Pluronic" F 68 ved hjelp av et FPLC-system (Pharmacia) (figur 2).

Amidolytisk aktivitet



Ved dette rensetrinn fraskilles en protease uten fibrinolytisk aktivitet. Fraksjonene med v-PA-aktivitet slås sammen.

(c) Gelfiltrering med NaCl

2 ml v-PA fra trinn (b) konsentreres ved frysetørking til 0,2 ml og kromatograferes i 50 mM tris, pH 8,0, 160 mM NaCl, 0,01 % "Pluronic" F 68 på en "Superose" 12 HR 10/30 kromatografikolonne (Pharmacia) ved hjelp av et FPLC-system (Pharmacia) (figur 3).

Amidolytisk aktivitet

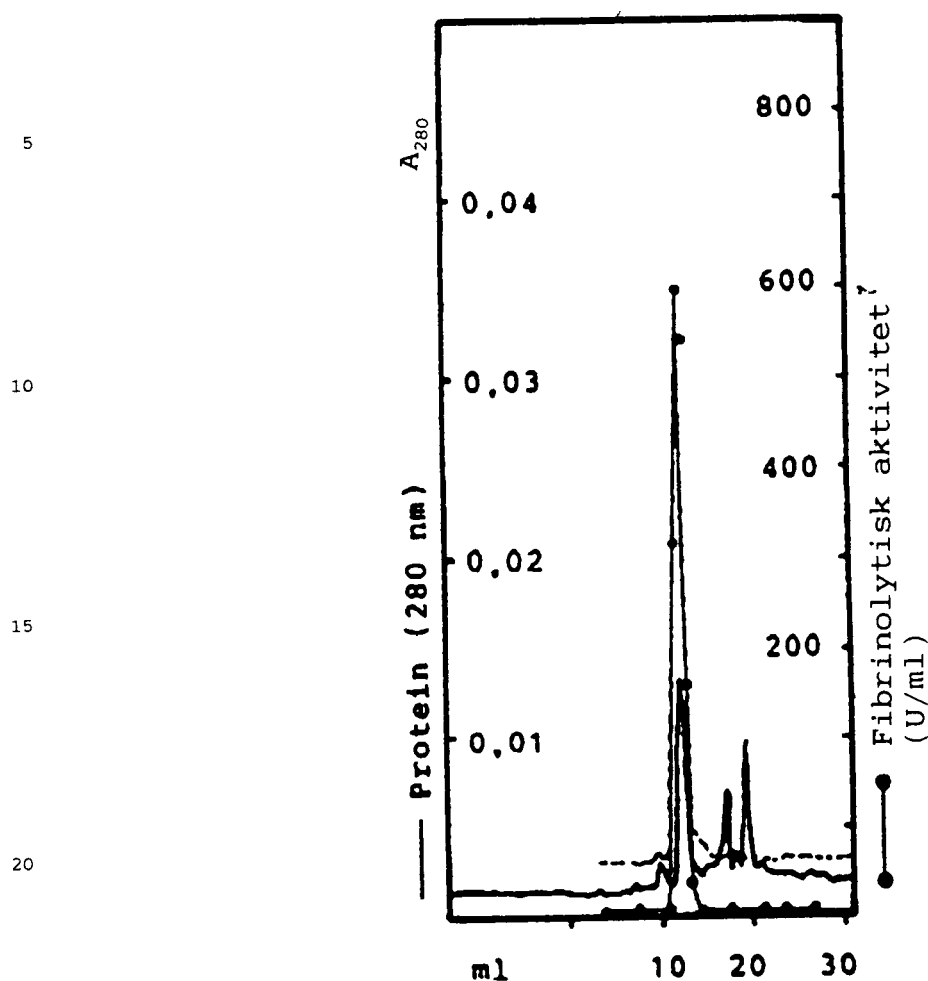
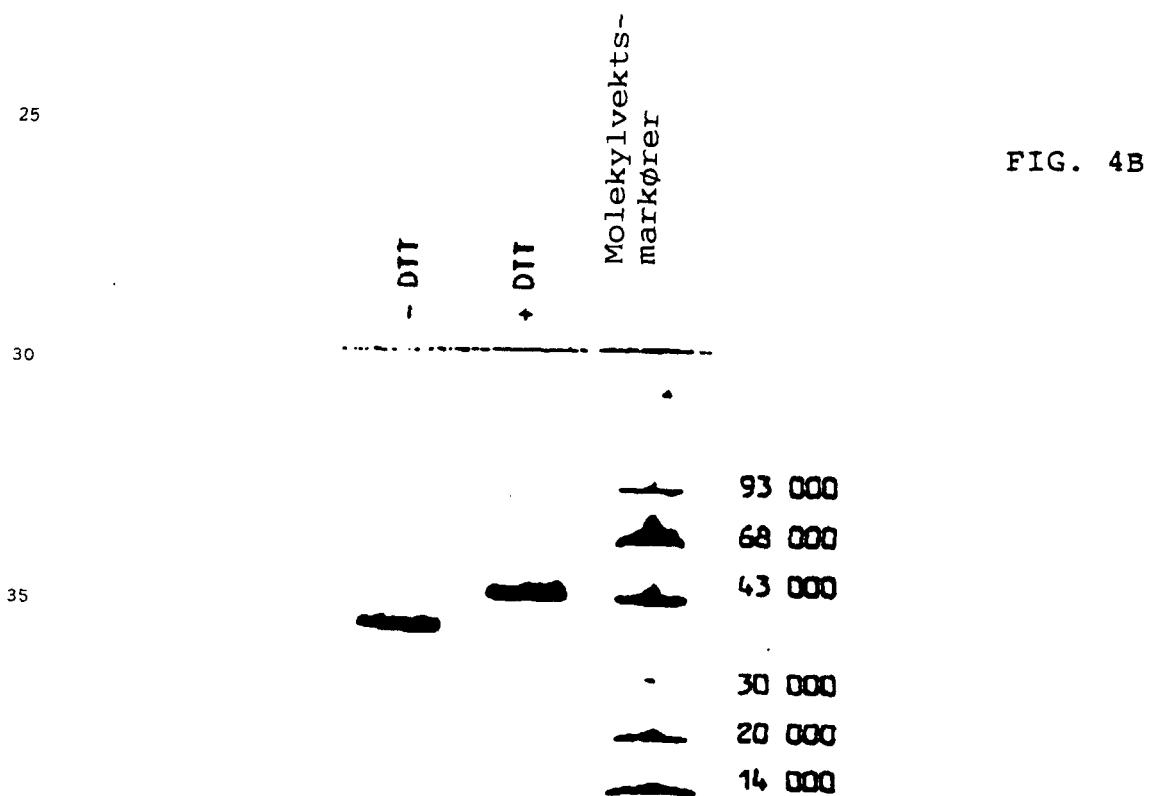
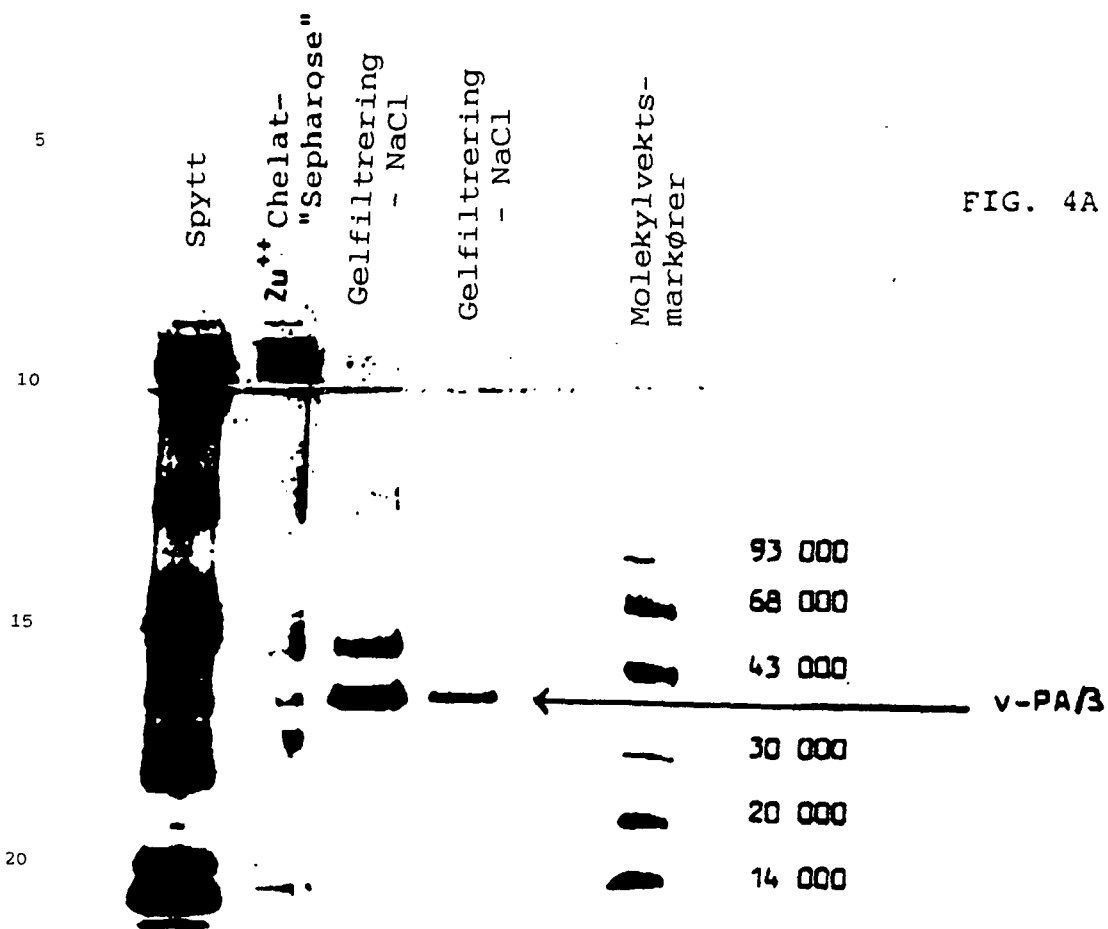


FIG. 3. Gelfiltrering

v-PA elueres som en homogen, skarp topp med molekylvekt rundt 40000.

Resultatene av renseprosessen er samlet i figur 4.

Figur 4A viser en prøve fra hvert rensetrinn i ikke-redukerende SDS-polyakrylamidgelelektroforese med den sensitive sølvfargingsmetoden. Figur 4B viser at v-PA β består av en proteinkjede, siden proteinet ikke splittes i to proteinbånd etter kløving av disulfidbroer med DTT. Den tilsynelatende økning i molekylvekt kan forklares ved linearisering av proteinkjeden med DTT.



Konsentrater av den anrikede aktivitet analyseres ved SDS-gelelektroforese under ikke-reduserende betingelser i en 8-25 % gradientgel. Flere av gelene farges med sølv for å synliggjøre proteinene, andre vaskes med "Triton" X-100 (1 %) for å fjerne SDS og plasseres på en fibrin-indikatorgel som inneholder plasminogen (Fibrin-Zymographie; Granelli-Piperno A. og Reich E., J. Exp. Med. 148:223-234, 1978).

Aktiviteten av det aktive stoff v-PA β , som påvises ved en lysering i indikatorgelen, tilsvarer et proteinbånd med en tilsynelatende molekylvekt på 39000 ± 3000 . Lyseringen kan påvises kun på plasminogenholdige fibrin-indikatorgeler, men ikke på plasminogenfrie fibrin-indikatorgeler eller på plasminogenholdige kasein-indikatorgeler. t-PA gir lyseringer også i plasminogenholdige kasein-indikatorgeler når det utsettes for den samme prosess.

Aktiviteten av det rensede aktive stoff v-PA β tilsvarer således et protein med en tilsynelatende molekylvekt på 43000 ± 2000 (under reduserende betingelser i SDS-polyakrylamidelektroforese, figur 4B) som kan omdanne plasminogen til plasmin i nærvær av fibrin og løse opp det fibrøse stoff fibrin. v-PA β er ikke i stand til å overføre plasminogen til plasmin i nærvær av kasein, i motsetning til t-PA som kan aktivere plasminogen også i nærvær av kasein.

Foreliggende oppfinnelse kan videre karakteriseres på grunnlag av eksemplene som beskrives nedenfor:

Eksempel 2

Rensing og separasjon av v-PA α_1 og v-PA β fra spytt fra vampyrflaggermusen *Desmodus rotundus*

30

(a) Zn⁺⁺-chelate-"Sephacrose"-kromatografi

20 ml spytt sentrifugeres ved 4 °C og 6000 x g. Supernatanten justeres til 20 mM tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,05 % "Pluronic" F 68. Et kromatografirør fylles med 8 ml Zn⁺⁺-chelate-"Sephacrose" ekvibrert med 10 mM tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM imidazol, 0,05 % "Pluronic" F 68, og spytt-supernatanten kromatograferes på denne. Kolonnen vaskes med ekvibreringsbuffer. Deretter elueres primært v-PA α_1 som fort-

satt inneholder en liten mengde v-PA β med 10 mM tris, pH 7,5, 1 M NaCl, 1 mM imidazol, 0,05 % "Pluronic" F 68 (figur 5). Deretter elueres v-PA β som fortsatt inneholder en liten mengde v-PA α_1 med en gradient fra 1-50 mM imidazol 10 mM tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,05 % "Pluronic" F 68.

Fibrinolytisk aktivitet

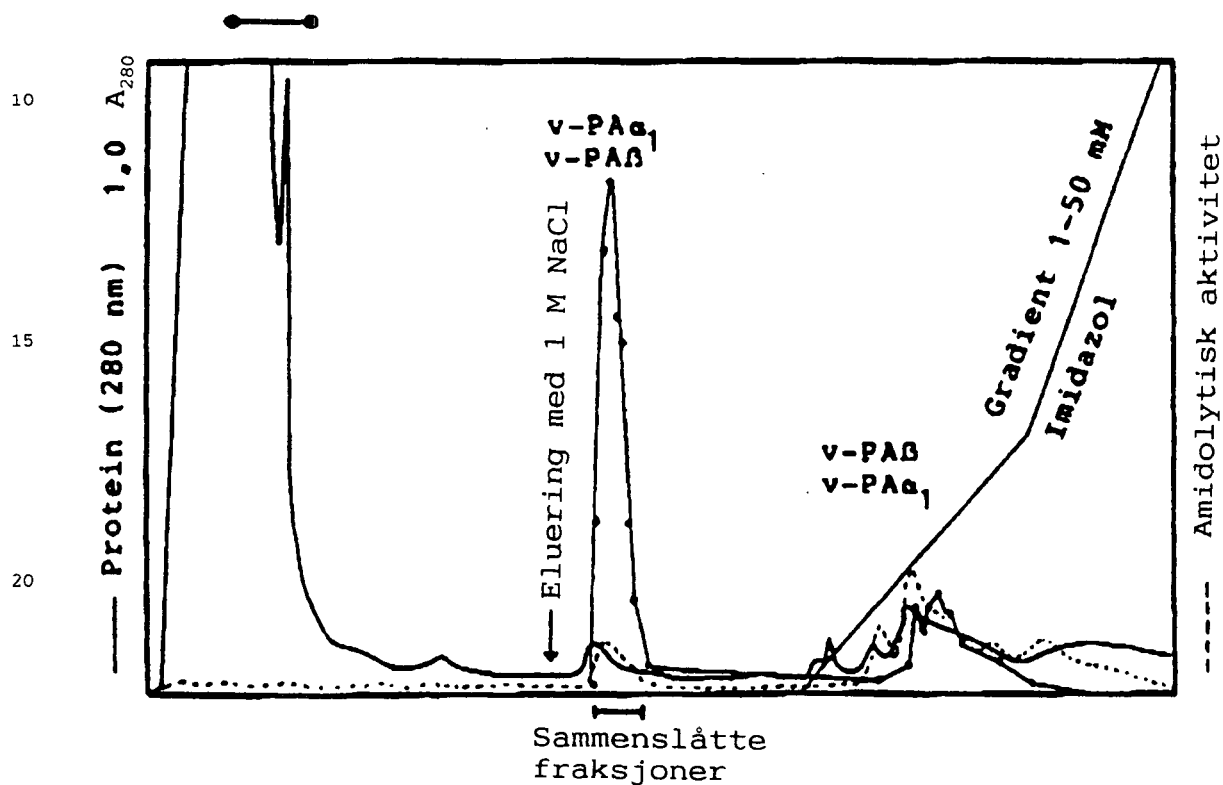


FIG. 5. Zn^{++} -chelate-"Sepharose"-kromatografi av spytt

(b) Hydroksoapatitt-kromatografi

En kromatografikolonne blir ladet med 8 ml hydroksoapatitt og ekvilibrerer med 50 mM tris, pH 8,0, 500 mM NaCl, 0,01 % "Pluronic" F 68. De aktive fraksjoner fra Zn^{++} -chelate-kromatografien (figur 5) sendes over hydroksoapatittkolonnen og vaskes med ekvilibreringsbuffer, og v-PA elueres med en gradient fra 0,5 til 100 mM Na-fosfat, pH 7,5, i 500 mM NaCl, 0,01 % "Pluronic" F 68 (figur 6). De aktive fraksjoner slås sammen.

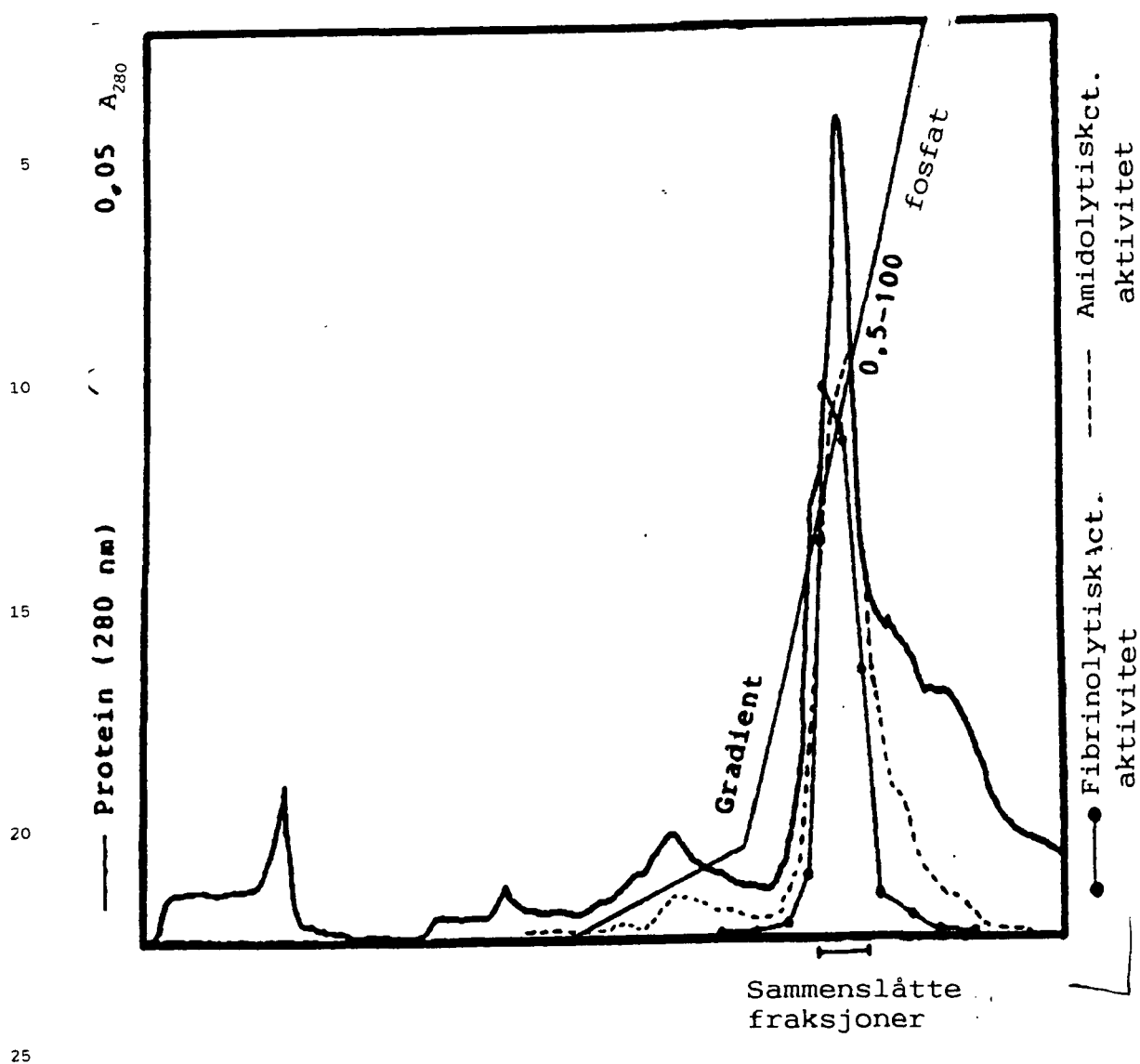


FIG. 6. Hydroksyapatitt-kromatografi av sammenslåtte fraksjoner fra Zn^{++} -chelatkromatografi

30 (c) Gelfiltrering

De sammenslåtte fraksjoner fra hydroksyapatitt-kromatografien (figur 6) dialyseres mot 20 mM tris, pH 8,0, 160 mM NaCl og konsentreres til 0,6 ml ved frysetørking. Konsentratet filtreres over en "Superose" 12 HR 16/50-kolonne ved hjelp av
 35 et FPLC-system (Pharmacia) (figur 7).

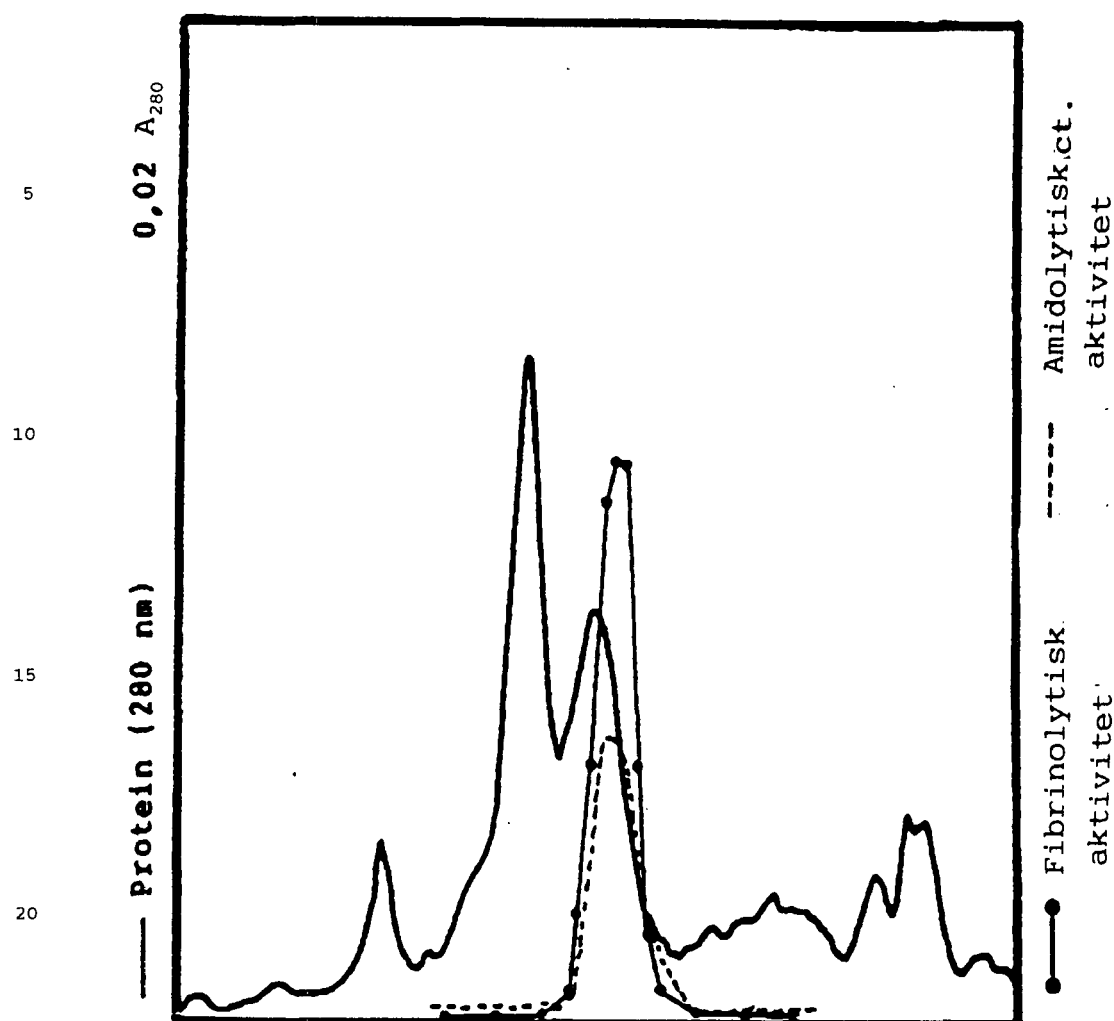


FIG. 7. Gelfiltrering av sammenslåtte fraksjoner fra
hydrokxyapatitt-kromatografi

Når et konsentrat av de aktive fraksjoner fra gelfiltreringen analyseres ved hjelp av SDS-polyakrylamidgelelelektroforese under ikke-reduserende betingelser og påfølgende farging med "Coomassie"-blått, synliggjøres et proteinbånd med en molekylvekt på 43000 (figur 8).

15

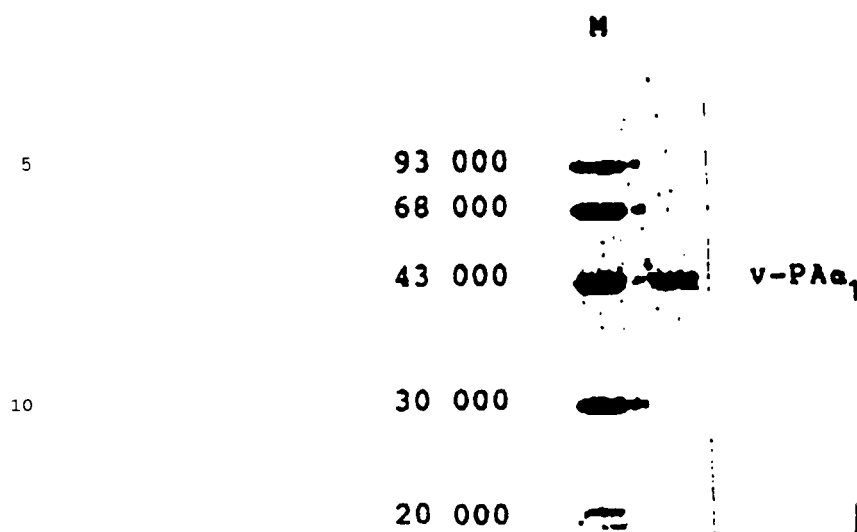


FIG. 8

15 SDS-polyakrylamidelektroforese av v-PA α_1 fra gelfiltreringen i figur 7. M = molekylvektsmarkørproteiner

Figur 8 viser at v-PA α_1 ikke inneholder andre proteiner. Dette rensede v-PA α_1 gir også en lysering med en
 20 identisk molekylvekt på 43000 i en indikatorgel (fibrin-
 zymografi), som beskrevet i eksempel 1c. Videre finnes denne
 lysering bare på plasminogenholdige fibrin-indikatorgeler og
 ikke på plasminogenholdige kasein-indikatorgeler.

25 Eksempel 3

Binding og eluering av v-PA α_1 og v-PA β til trypsininhibitor
 DE-3 fra frø av *Erythrina latissima* (ETI)

50 mg ETI (Erutech Services LTD, Arcadia, Sør-Afrika)
 kobles kovalent til 6,6 g aktivert CH "Sepharose" 4B (Pharma-
 30 cia) i henhold til de fremgangsmåter produsenten anbefaler.
 16 ml spytt justeres til pH 7,5 med 1 M tris, pH 6,8, og
 sentrifugeres i 10 min ved 4 °C og 6000 x g. Et kromatografi-
 rør av type HR 10/2 (Pharmacia) fylles med 2 ml ETI CH "Sepha-
 rose" 4B (se over). Affinitetskromatografien utføres ved hjelp
 35 av et FPLC-system (Pharmacia). Spyttsupernatanten sendes over
 ETI CH "Sepharose" 4B-kolonnen og vaskes grundig med 20 mM
 tris, pH 7,5, 400 mM NaCl, 0,01 % "Pluronic". Eluering utføres
 med 20 mM tris, pH 7,5, 400 mM NaCl, 1,6 M KSCN, 0,01 %

"Pluronic" F 68. I dette trinn vil fibrinolytisk så vel som amidolytisk aktivitet elueres sammen med én proteintopp.

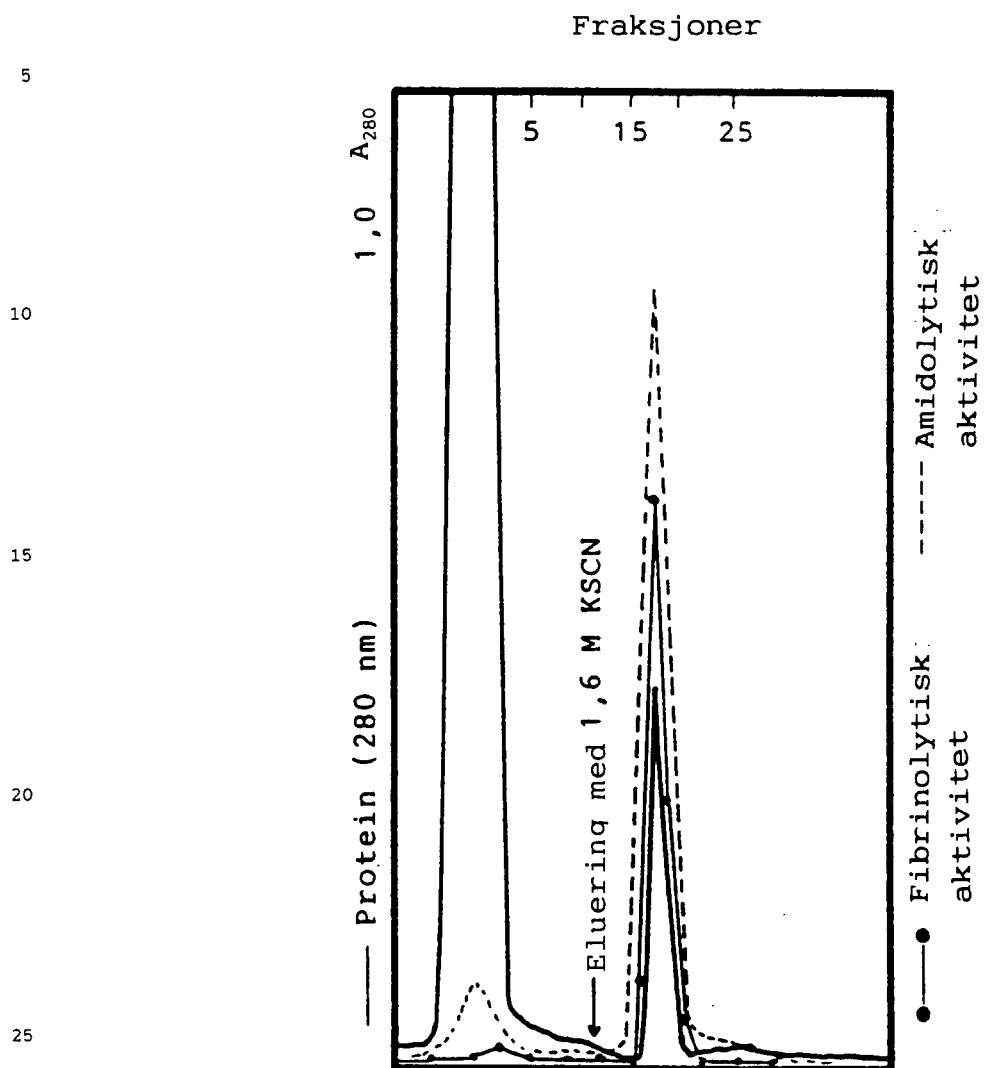
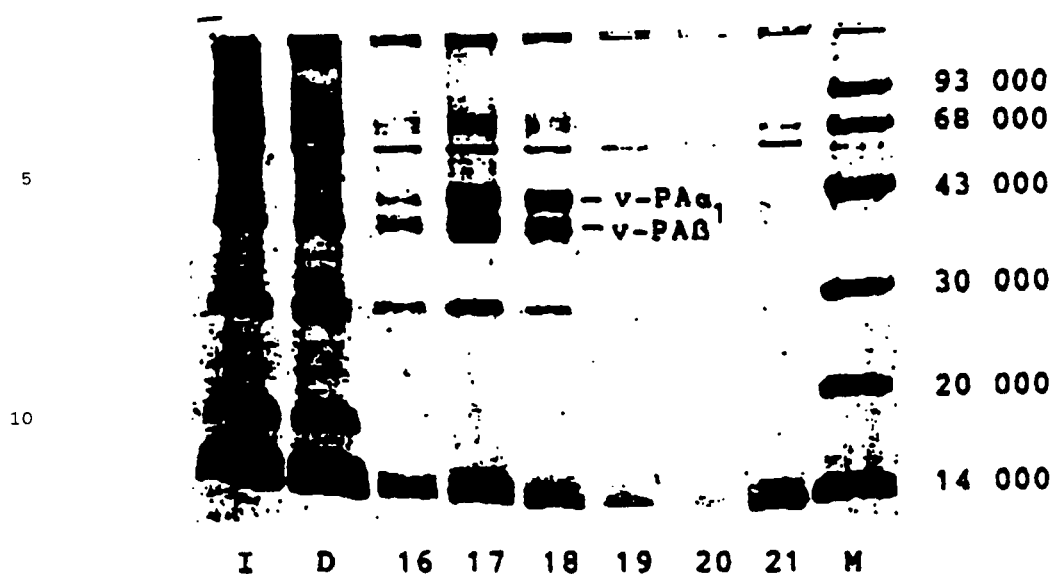


FIG. 9. ETI "Sephacrose" 4B-kromatografi

Analyse av produktet fra denne kromatografi ved SDS-polyakrylamidgelelektroforese under ikke-reduserende betingelser bekrefter en sterk anrikning av de to v-PA-formene v-PA α_1 og v-PA β .



15 FIG. 10

SDS-polyakrylamidgelelektroforese (12,5 %) under ikke-redu-
serende betingelser med påfølgende "Coomassie"-blå-farging. I:
10 μ l spytt; D: 10 μ l ubundet materiale; M: molekylvekts-
markørproteiner; 16-21: fraksjonsnumre fra figur 9

20

De to molekulære former av v-PA i denne porsjon spytt
bindes under de ovennevnte betingelser til ETI-CH "Sephrose"
4B, og kan elueres i nærvær av 1,6 M KSCN eller andre kaotrope
forbindelser. Dette gjelder for alle former av det aktive
25 stoff.

Eksempel 4

Binding og eluering av de aktive stoffer v-PA α_1 og v-PA β til
heparin-"Sephrose"

30

En upakket FPLC-kolonne (HR 5/5) fylles med 1 ml
heparin-"Sephrose" (Pharmacia). Fraksjon 18 fra ETI-CH
"Sephrose" 4B-kromatografien (eksempel 3, figurene 9 og 10)
dialyseres mot 20 mM tris, pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,01 %
"Pluronic" F 68 og kromatograferes over heparin-"Sephrose"
35 ved hjelp av et FPLC-system (Pharmacia). Etter påsetting av
dialysatet vaskes kolonnen med 20 mM tris, pH 7,2, 50 mM NaCl,
0,01 % "Pluronic" F 68, og elueres så med en gradient fra 50
til 1000 mM NaCl i 20 mM tris, pH 7,2, 0,01 % "Pluronic" F 68
(figur 11).

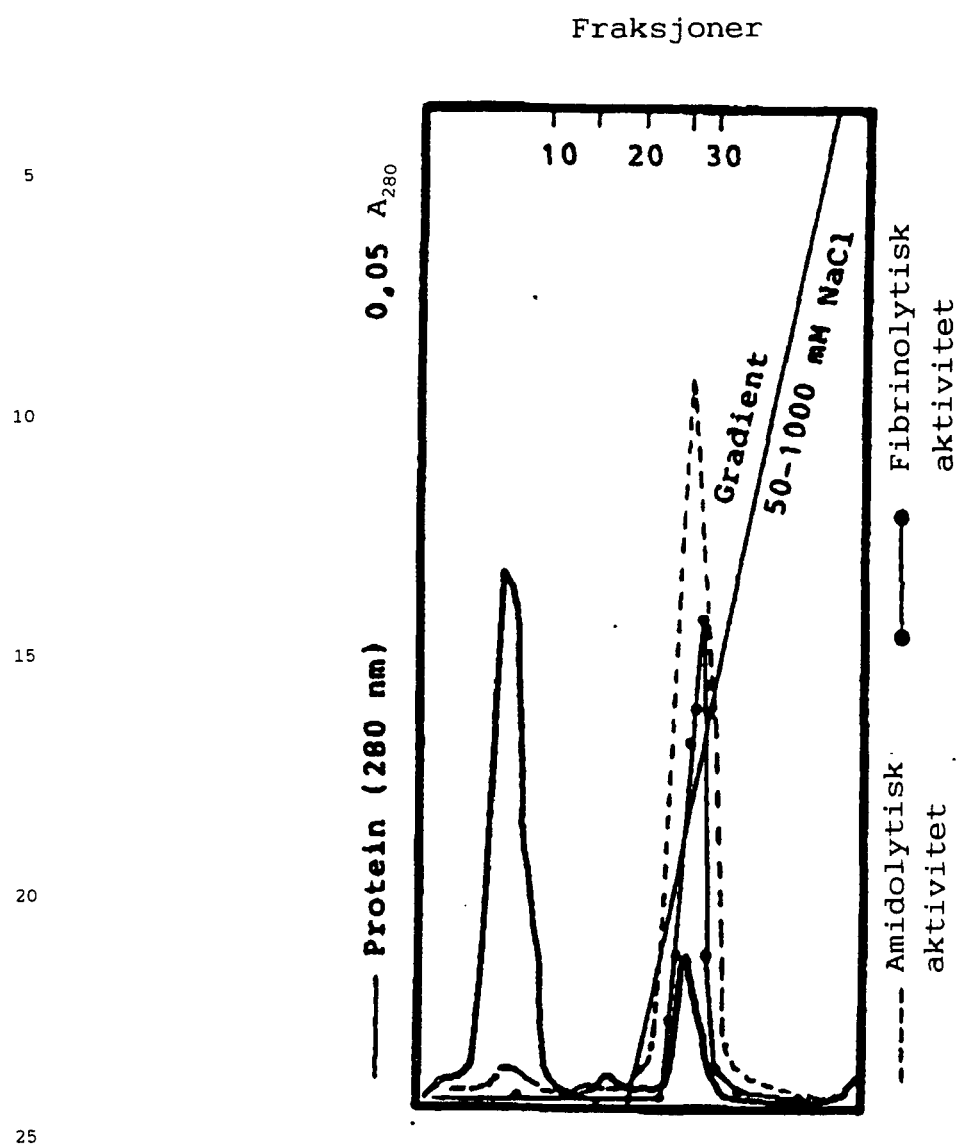


FIG. 11

Heparin-"Sepharose"-kromatografi av det aktive stoff v-PA
 etter forutgående rensing på ETI-CH "Sepharose" 4B (eksempel
 30 3, figurene 9 og 10)

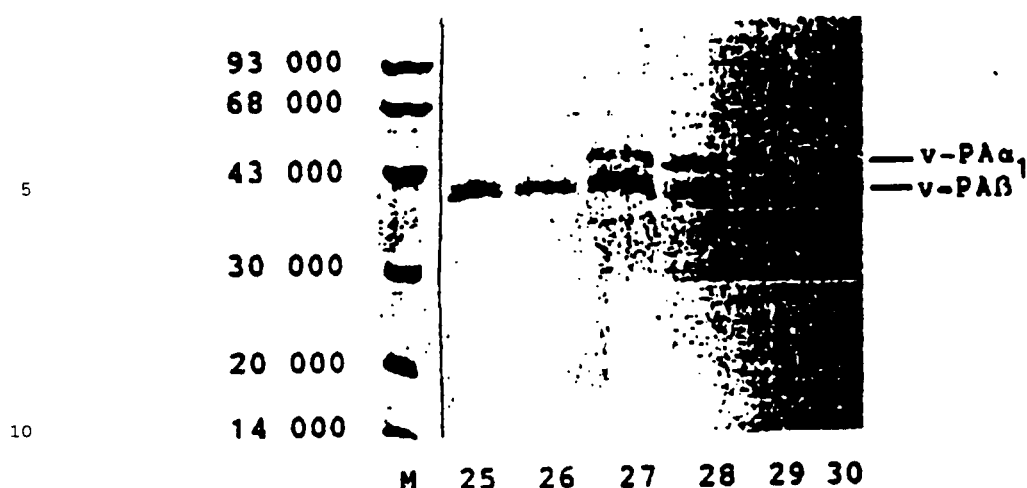


FIG. 12

SDS-polyakrylamidgelelektroforese (12,5 %) under ikke-redu-
 15 serende betingelser av fraksjoner med aktivt stoff fra
 heparin-"Sephacrose"-kromatografi (figur 11) med påfølgende
 "Coomassie"-blå-farging. M: molekylvektsmarkørproteiner.
 Tallene tilsvarende fraksjoner fra figur 11

20 Ved hjelp av heparin-"Sephacrose"-kromatografi er det
 mulig å binde og eluere de molekylære former v-PA α₁ og v-PA β,
 dvs. å rense dem. Som vist i figurene 11 og 12 bindes den
 molekylære v-PA-form v-PA β svakere til heparin-"Sephacrose"
 enn den molekylære form v-PA α₁, dvs. at en lavere NaCl-konsen-
 25 trasjon kreves for eluering av v-PA β enn for eluering av v-PA
 α₁. Således er det mulig å skille de to v-PA-former fra hver-
 andre ved de kromatografiske metoder som er vist i dette
 eksempel.

30 Eksempel 5

Binding og eluering av de aktive stoffer v-PA α₁ og v-PA β til
 fibrin-"Celite"

Affinitetsmediet fibrin-"Celite" fremstilles ifølge
 kjente metoder (Husain, S., Lipinski, B. og Gurewich, V. i
 35 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:4265-4269, 1981). En kromato-
 grafikolonne HR 5/5 (Pharmacia) fylles med 1 ml fibrin-
 "Celite". Fraksjon 17 fra ETI-CH "Sephacrose" 4B-kromatografien
 (eksempel 3, figur 9 og 10) dialyseres mot 20 mM tris, pH 8,0,

20 mM NaCl, 0,01 % "Pluronic" F 68 og kromatograferes over fibrin-"Celite" ved hjelp av et FPLC-system (Pharmacia). Etter påsetting av den dialyserte fraksjon vaskes kolonnen med 20 mM tris, pH 8,0, 20 mM NaCl, 0,01 % "Pluronic" F 68, og det aktive stoff elueres med en gradient fra 20 til 1000 mM NaCl i 20 mM tris, pH 8,0, 0,01 % "Pluronic" F 68 (figur 13).

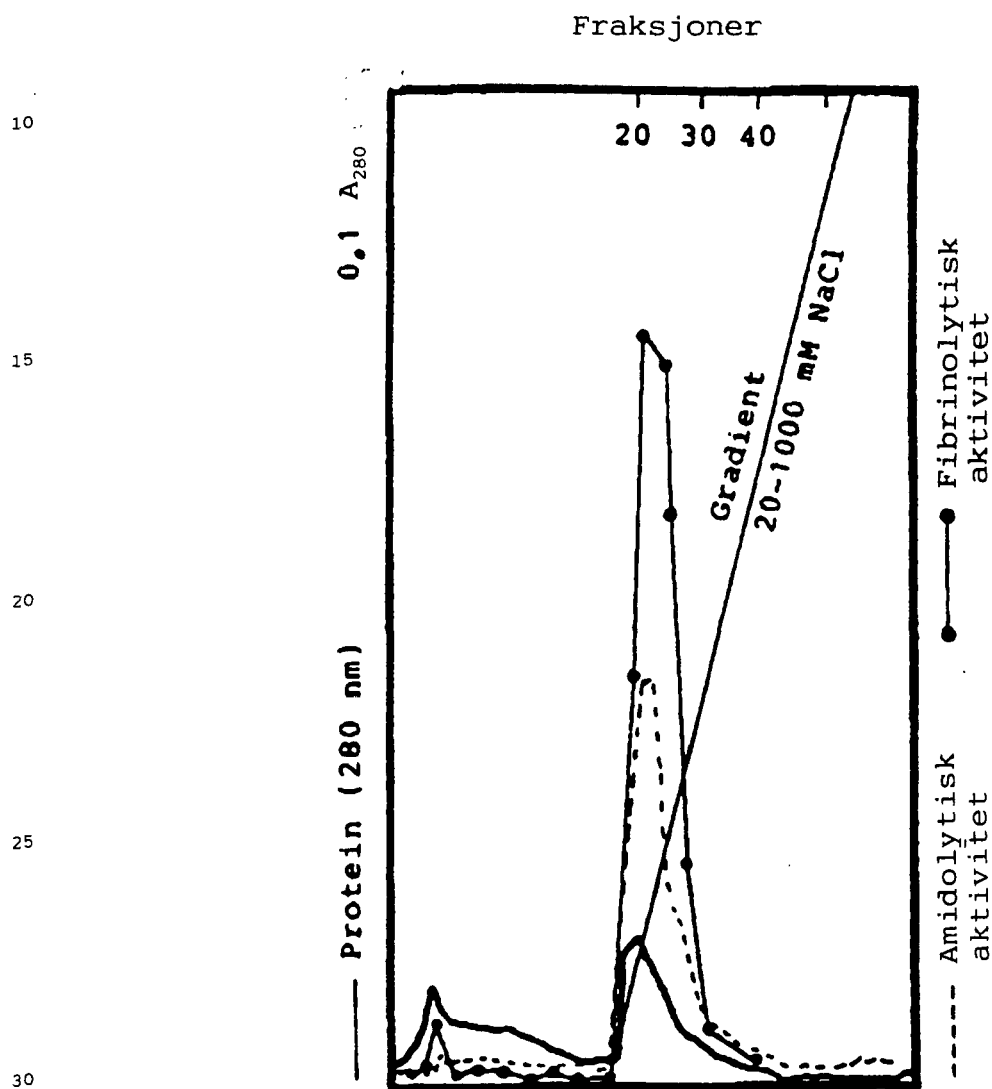


FIG. 13

Fibrin-"Celite"-kromatografi av det aktive stoff v-PA (v-PA α_1 og v-PA β) etter forutgående rensing på ETI-CH "Sepharose" 4B (eksempel 3, figurene 9 og 10)

De v-PA-holdige fraksjoner analyseres så ved SDS-polyakrylamidgelelektroforese (figur 14).

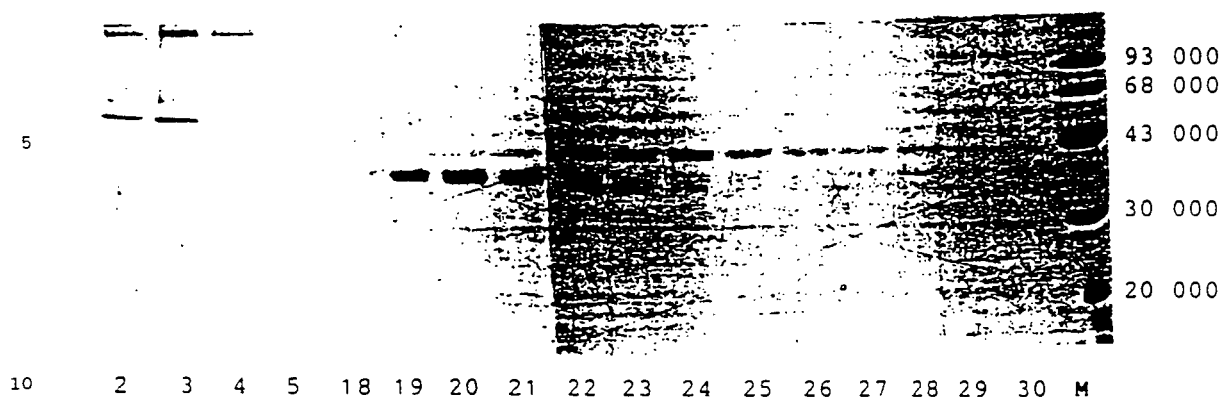


FIG. 14

SDS-polyakrylamidgelelektroforese (12,5 %) under ikke-redu-
 15 serende betingelser av fraksjoner med aktivt stoff fra fibrin-
 "Celite"-kromatografi (figur 13) med påfølgende "Coomassie"-
 blå-farging. M: molekylvektsmarkørproteiner. Tallene tilsvare
 fraksjoner fra figur 13

20 De aktive stoffer v-PA α_1 og v-PA β bindes til
 fibrin-"Celite" ved lave NaCl-konsentrasjoner og kan elueres
 ved å øke NaCl-konsentrasjonen i bufferen. I dette trinn kan
 det observeres at v-PA β tydeligvis bindes svakere til fibrin-
 "Celite" enn v-PA α_1 , siden v-PA α_1 -formen elueres ved høyere
 25 NaCl-konsentrasjon enn v-PA β . Denne rensemetode kan således
 nyttes til å skille v-PA β og v-PA α_1 .

Eksempel 6

N-terminal aminosyresekvensanalyse av de rensede v-PA-former
 30 v-PA α_1 og v-PA β

Fraksjoner som inneholder rensed v-PA α_1 (eksempel 2,
 figur 8) eller rensed v-PA β (eksempel 1, figur 4), analyseres
 på en 12,5 % polyakrylamidgel under ikke-reduserende betingel-
 ser etter dialyse mot en passende buffer. Etter elektroforesen
 35 fjernes gelen fra elektroforeseapparatet og overføres til en
 polyvinylidendifluorid-membran (Immobilon, Millipore Corp.,
 USA) i henhold til en gjengs metode (Matsudaira, P. i J. Biol.
 Chem. 262:10035-10038, 1987). Det tilsvarende proteinbånd

skjæres ut med skalpell, og den N-terminale aminosyresekvens bestemmes direkte i en automatisk "477 A Protein Sequencer/120 A Analyzer" (Applied Biosystems, USA). Analysene utføres flere ganger. De oppnådde sekvenser er gitt nedenfor:

5

v-PA α_1 :

1	5	10	15
Ala	Tyr Gly Val Ala X	Lys X Glu Ile Thr Gln Met	Thr Tyr Arg

10

v-Pa β :

1	5	10	15
Ala	Tyr Gly Gly X Ser Glu Leu Arg Cys Phe Asn Gly Gly Thr X		
15	Gln Ala Ala		

(X = ikke bestemt med sikkerhet)

Ved hjelp av disse sekvenser ble et cDNA-bibliotek
20 fra spyttkjertel fra *Desmodus rotundus* screenet (eksempel 18).

Eksempel 7

Plasminogenaktivering med det aktive stoff v-PA β , renset i
henhold til eksempel 1, sammenlignet med t-PA

25 Ved inkubering av en spesifikk plasminogenaktivator (PA) med en tilstrekkelig høy konsentrasjon plasminogen (PLG) i en buffer, f.eks. 50 mM tris, pH 7,4, 20 mM NaCl ved 37 °C, vil plasmin produseres i henhold til følgende prinsipp:

30 $PA + PLG (\pm \text{stimulator}) \rightleftharpoons [PA/PLG (\pm \text{stimulator})]$

↓↑

PA + plasmin ($\pm$ stimulator)

Det dannede plasmin kan påvises med et kromogent tri-
35 peptid H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S 2251) som er meget spesifikt for denne protease. Reaksjonen forløper i henhold til følgende prinsipp:

Plasmin + H-D-Val-Leu-Lys-pNA

↓↑

[plasmin/H-D-Val-Leu-Lys-pNA] → plasmin + pNA

Hastigheten for dannelsen av pNA (p-nitroanilin) kan bestemmes fotometrisk ved 405 nm og er proporsjonal til konsentrasjonen av enzymet plasmin. Ved å koble de to prinsipper er det således mulig å måle hastigheten for dannelsen av plasmin, som er et uttrykk for aktiviteten av plasminogenaktivatoren. Figur 15 viser hastigheter for dannelsen av plasmin med t-PA og med v-PA i fravær og i nærvær av stimulatoren fibrinogen (det koagulerende substrat) og fibrin (det fibrøse stoff i blodkoageler som skal løses opp).

15

20

25

30

35

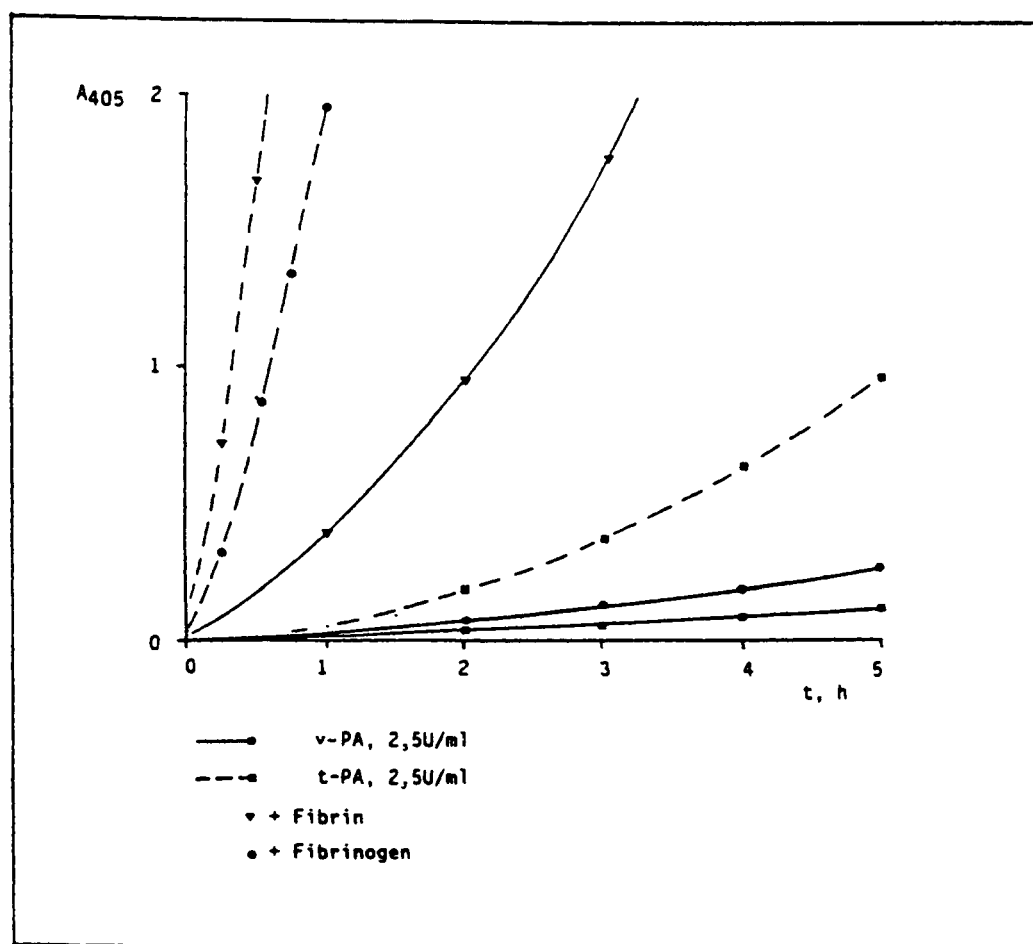


FIG 15

Hastighet for dannelsen av plasmin med v-PA β sammenlignet med t-PA i nærvær og fravær av fibrin eller fibrinogen

Testen utføres i 96-brønners mikrotiterplater. Hver brønn inneholder et totalt volum på 220 μ l. Konsentrasjonen av plasminogen er 0,5 μ M, av H-D-Val-Leu-Lys-pNA 0,68 mM, av t-PA 0,05 IU, og den benyttede aktivitet av v-PA, målt i "The International Clot-Lysis Assay" (Gaffney, P.J., Curtis, A.D., Thrombos. Haemostas. 53:134-136, 1985) er 10 ganger høyere, dvs. tilnærmet 0,5 U. Konsentrasjonen av stimulatorene utgjør tilnærmet 20 μ g/brønn.

Det fremgår at t-PA aktiverer plasminogen selv i fravær av en stimulator og med en svært høy aktiveringshastighet selv i nærvær av fibrinogen. I det beskrevne målesystem vil v-PA aktivere plasminogen utelukkende i nærvær av det fibrøse stoff fibrin.

Eksempel 8

Trombolytisk aktivitet av v-PA α_1 og v-PA β sammenlignet med aktiviteten av t-PA

Den trombolytiske aktivitet av det nye aktive stoff sammenlignes med t-PA i et nyutviklet "Micro-Clot-Lysis Assay" (MCLA). 100 μ l porsjoner av friskt humant helblod pipetteres ut i brønnene i mikrotiterplater og tilsettes 10 μ l av et koagulerende stoff ("Thromborel", Behring-Werke) og inkuberes ved 37 °C i 1 time. De dannede blodkoageler vaskes to ganger med fosfatbufret natriumkloridløsning (PBS) før de tilsettes 100 μ l autologt plasma som på forhånd er skaffet til veie ved sentrifugering. Plasmaet tilsettes så t-PA eller v-PA i konsentrasjoner på 1,56-12,5 U/ml. Mikrotiterplatene inkuberes i 18 timer ved 37 °C i et fuktig kammer. Etter inkubasjonen ristes platene på en vibrerende plattform (Red Rotor) hvorefter en plasmaprøve tas ut fra hver brønn, fortynnes med dobbeltdestillert vann 1:6 hvorved røde blodceller frigitt ved lyse sprekker, og det frigitte røde blodpigment bestemmes fotometrisk ved 492 nm i et mikrotiterplatefotometer.

Lyse *in vitro* av blodkoagel i humant helblod: virkning av plasminogenaktivatorer

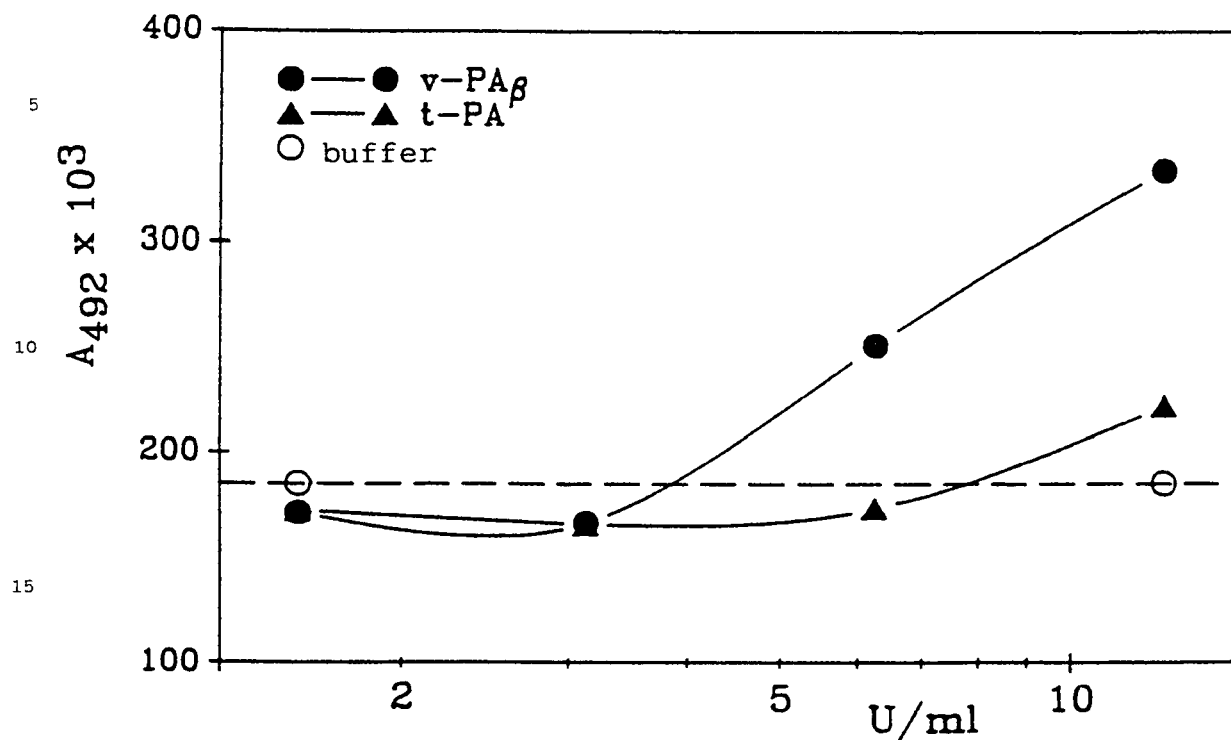


FIG. 16a

20

Lyse *in vitro* av blodkoagel i humant helblod: virkning av plasminogenaktivatorer

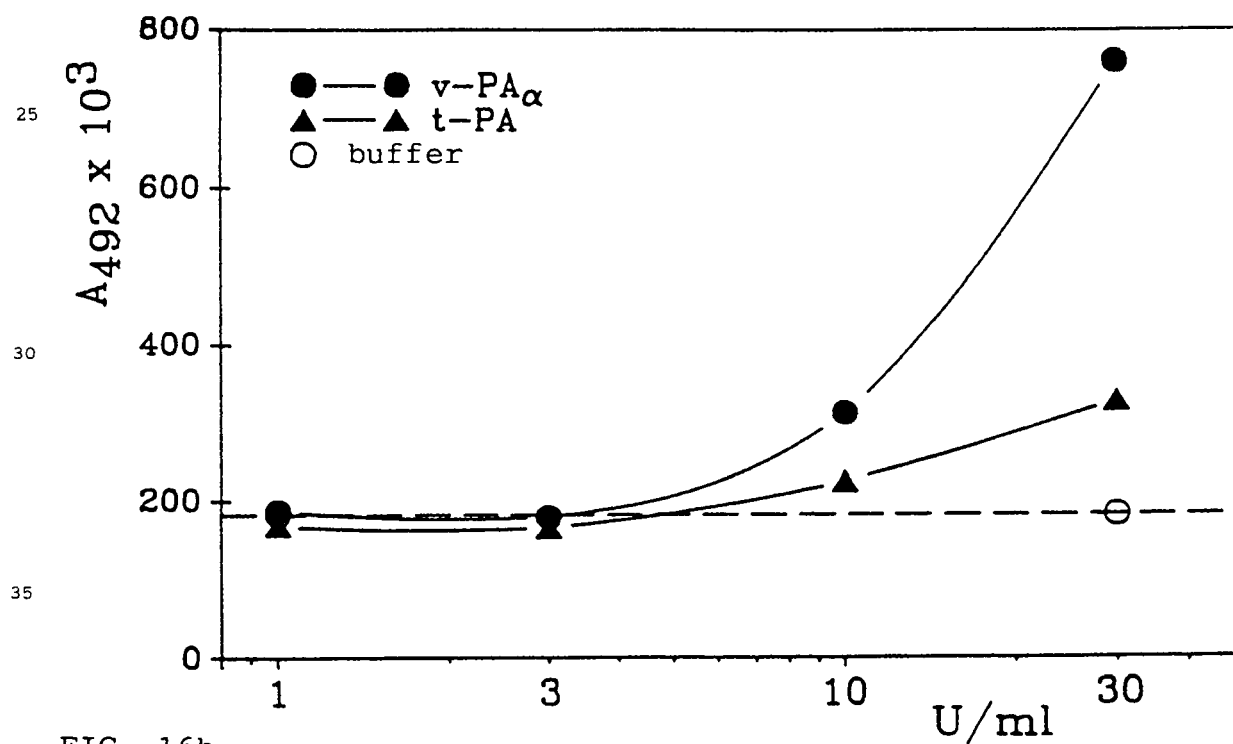


FIG. 16b

Resultatet av undersøkelsen er vist i figurene 16a og 16b: Sammenlignet med et standard t-PA vil ekvivalente konsentrasjoner av det nye aktive stoff lysere (som bestemt i "The International Clot-Lysis Assay") tromber i humant helblod bedre enn t-PA. Selv tilnærmet 3 U/ml av det nye aktive stoff v-PA β viser signifikant trombolytisk effekt i det beskrevne målesystem, mens 3 U t-PA ikke gir resultater som avviker fra kontrollen.

Tidsavhengigheten for trombolyse i humant helblod med t-PA og v-PA undersøkes i et tilsvarende eksperiment.

6,25 U t-PA hhv. 12,5 U v-PA inkuberes i systemet beskrevet over i 23 timer ved 37 °C. Etter 15 timer tas en prøve ut annenhver time og behandles som beskrevet for den fotometriske måling. Resultatet er vist i figurene 17a og 17b.

Lyse *in vitro* av blodkoagel i humant helblod

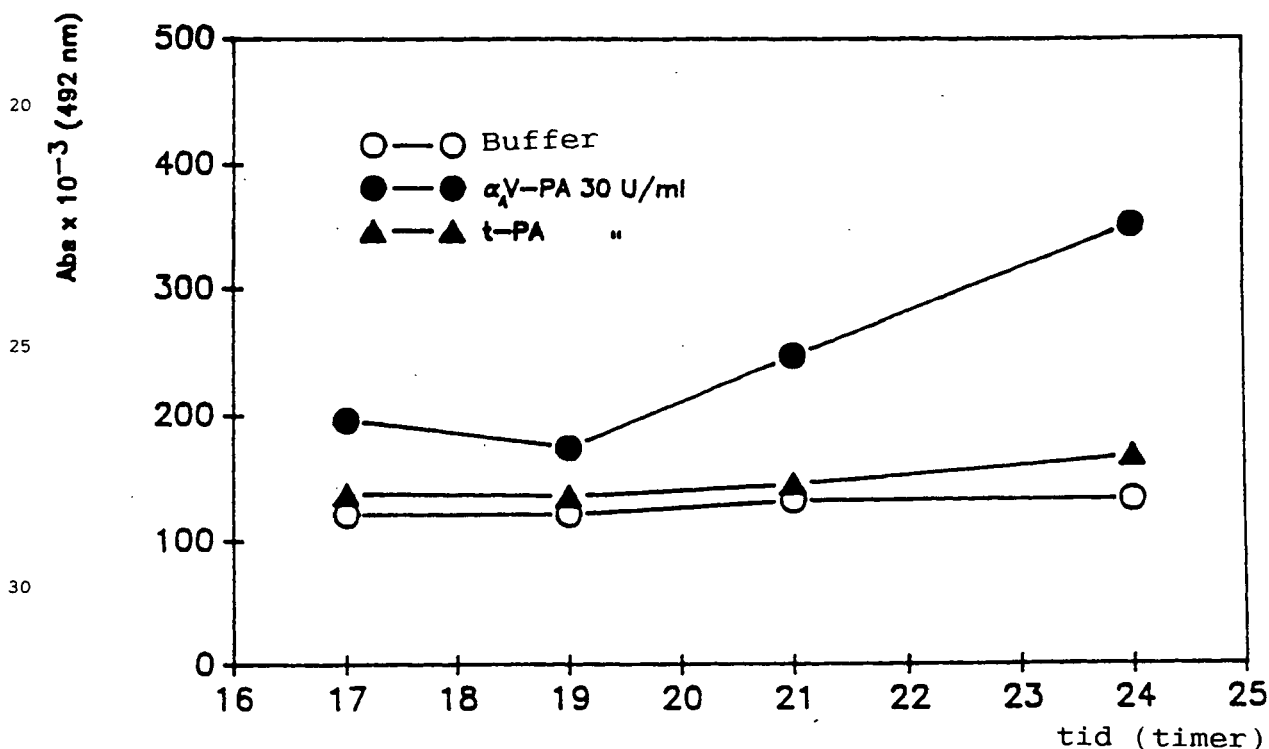


FIG. 17a

Lyse *in vitro* av blodkoagel i humant helblod

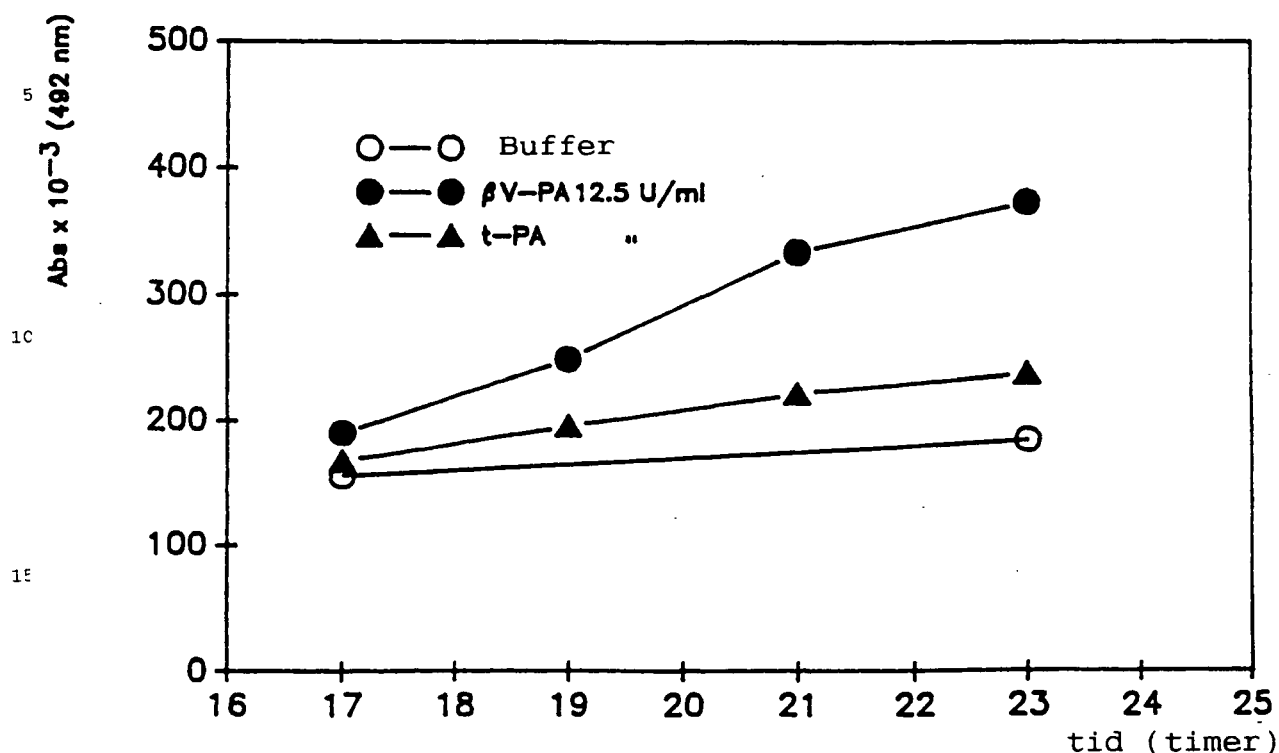


FIG. 17b

Starten av trombolysen, målt som frigivning av røde blodceller fra tromben, er tydelig raskere med det aktive stoff enn med t-PA. 6,25 enheter av det nye aktive stoff viser økt trombolyse etter 23 timer sammenlignet med den doble aktivitet av t-PA (12,5 enheter).

Eksempel 9

Serinproteaser reagerer spesifikt med "aktivt sete-titratoren" diisopropylfluorfosfat (DIFP)

Det aktive stoff bufres til pH 8,0 og blandes i et forhold på 1:20 med ^3H -DIFP i propylenglykol. Porsjonen inkuberes over natten ved romtemperatur. Et uttak av porsjonen analyseres på en 12,5 % SDS-gel under ikke-reduserende betingelser. Gelen inkuberes så i 30 min ved romtemperatur i "Amplify" (Amersham) og tørkes. Gelen eksponeres så i 4 dager, og røntgenfilmen fremkalles. Serinproteaser som har det radioaktivt merkede DIFP inkorporert, vil være synlige på filmen

som svertede bånd (figur 18). t-PA gir f.eks. et lett svertet hovedbånd med en tilsynelatende molekyllvekt på 68000 ± 5000 , i motsetning til dette gir det nye aktive stoff et sterkt svertet hovedbånd med molekyllvekt 39000 ± 2000 (v-PA β) og et svertet bånd ved 43000 ± 2000 (v-PA α_1). En kontrollgel skaffet til veie ved identiske elektroforetiske betingelser, vaskes med 1 % "Triton" X-100 og plasseres så på en fibrin- og plasminogenholdig indikatorgel. Posisjonen av aktivitet fra det aktive stoff faller sammen med de svertede bånd av ^3H -DIFP-merkede serinproteaser som tilsvarende stoffets aktive prinsipp.

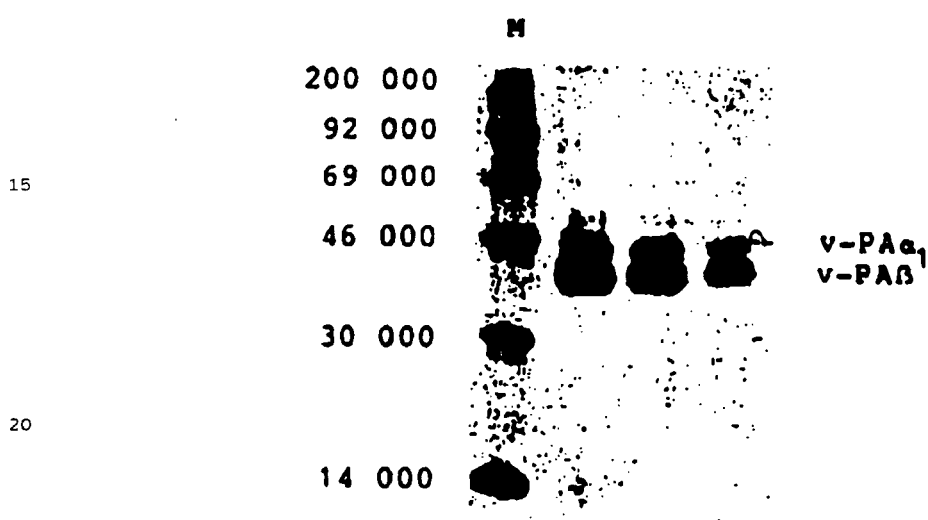


FIG. 18. Autoradiogram av ^3H -DIFP-behandlet aktivt stoff applisert på gelen i tre forskjellige konsentrasjoner

Eksempel 10

Fibrinogennedbrytning *in vitro* med t-PA og v-PA β

Når t-PA inkuberes i humant plasma ved 37°C , vil konsentrasjonen av koagulerbart fibrinogen avta på en tids-avhengig måte. Dette skyldes den relative fibrinspesifisitet av t-PA og er en karakteristisk egenskap ved dette trombolytiske stoff. 3 mg koagulerbart humant fibrinogen løses i 1 ml 50 mM tris, pH 7,4, 40 mM NaCl, og løsningen gjøres $1\ \mu\text{M}$ med hensyn på humant plasminogen. Uttak av porsjonen tilsettes hhv. 3,1, 6,25 og 12,5 U t-PA eller de samme mengder v-PA. En tredje porsjon uten plasminogenaktivator fungerer som kontroll. Seks porsjoner benyttes pr. behandlingsgruppe. Umiddelbart etter tilsetning av plasminogenaktivatorene tas én prøve

ut av alle porsjoner, og koagulerbart fibrinogen bestemmes i henhold til Clauss (Clauss, V.A., Acta Haematol. 17:237-246, 1957). En del av uttaket analyseres videre ved gelelektroforese. Videre uttak fra porsjonene som inkuberes ved 37 °C, 5 gjøres etter 2, 4 og 6 timer. Resultatene av fibrinogenmålingene er vist i tabell 1.

10

15

20

25

30

35

TABELL 1

Inkuba- sjonstid, timer	U/ml	t-PA			v-Pa			K
		12,5	6,25	3,1	12,5	6,25	3,1	+ Plg
0		10,3	9,7	9,1	10,5	10,3	10,1	10,0 [sek]
		10,0	9,1	10,6	10,4	9,7	10,4	9,7
		10,2	9,4	9,9	10,5	10,0	10,3	9,9
		12,6	11,3	10,5	10,0	9,7	8,9	9,5
		12,8	11,0	10,8	9,4	9,6	9,8	9,7
		12,7	11,2	10,7	9,7	9,7	9,4	9,6
2		>300			12,8	11,9	11,6	10,9
					12,5	11,2	11,5	11,1
					12,7	11,6	11,6	11,0
					11,3	11,5	10,5	12,1
					11,4	11,2	10,6	11,9
					11,4	11,4	10,6	12,0
					11,4	11,4	10,6	12,0
4		>300			14,5	13,1	12,8	12,4
					13,7	13,1	11,9	12,6
					14,1	13,1	12,4	12,5
					18,6	11,6	13,2	11,8
						12,1	14,2	12,4
						11,9	13,7	12,1
6		>300			13,9 14,4	17,6	12,2 13,1	12,6
					13,1 13,6	17,1	15,8 12,3	11,8
					13,8	17,1	13,4	12,2
					12,3	12,8	11,9	13,0
					12,1		12,2	13,3
					12,2	121,0	12,1	13,2

Plg = 1 μ M plasminogen, 40 μ l/ml porsjon [50 U/ml]
 mg koagulerbart fibrinogen/ml porsjon i 50 mM tris,
 40 mM NaCl, pH 7,4 (fortynningsbuffer)

Koagulasjonstider i henhold til Clauss er vist i sekunder. Allerede etter 2 timers inkubasjon inneholder de t-PA-holdige porsjoner ikke koagulerbart fibrinogen, koagulasjonstidene var >300 s. I motsetning til dette er det ikke
5 tegn til fibrinogennedbrytning verken i kontrollporsjonene eller i porsjonene som var tilsatt det nye aktive stoff. Eksperimentet viser den vesentlig høyere, og kanskje absolutte, fibrinspesifisitet av det nye aktive stoff v-PA β sammenlignet med t-PA.

10 Ved analyse av porsjonene ved gelelektroforese kan det videre bekreftes at fibrinogenet i porsjonene med det nye aktive stoff ikke kan skjernes fra fibrinogen i kontrollporsjonene selv etter 6 timers inkubasjon, mens kun nedbrutt fibrinogen kan påvises i porsjonene med t-PA allerede etter
15 2 timer.

Eksempel 11

Fibrinbinding av forskjellige plasminogenaktivatorer og v-PA α_1 og v-PA β

20 100 μ l plasminogenfritt fibrinogen (2 mg/ml) i PBS/0,01 % "Tween" 80 tilsettes 10 μ l med forskjellige plasminogenaktivatorer i forskjellige konsentrasjoner og 10 μ l trombin (0,3 U), og inkuberes ved 37 °C i 10 min. Det dannede fibrin fjernes ved sentrifugering i 5 min ved 10000 x g, og
25 gjenværende plasminogenaktivator-aktivitet måles i supernatanten ved hjelp av fibrinplatetestmetoden og relateres til startvolumet. Parallelt og under samme betingelser fremstilles plasminogenaktivator-løsninger uten fibrin (kontroll, ingen binding).

30

35

Binding av PA til plasminogenfritt fibrin

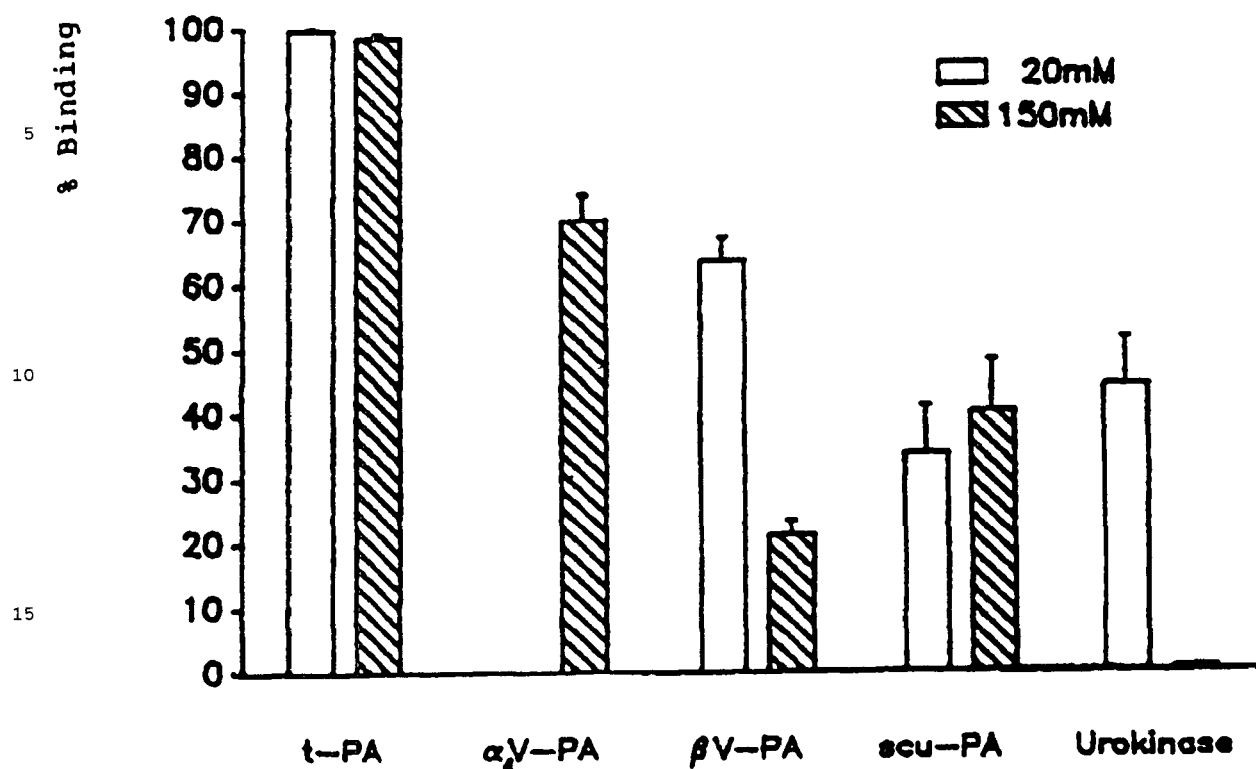


FIG. 19

v-PA α_1 viser like god fibrinbinding som t-PA (figur 19). I motsetning til dette viser v-PA β en vesentlig lavere fibrinaffinitet enn v-PA α_1 . Fibrinaffiniteten til v-PA β er videre sterkt avhengig av NaCl-konsentrasjonen (figur 19).

Eksempel 12

Kinetisk sammenligning av Glu-plasminogenaktivering med t-PA og v-PA β

(A) 20 μ l plasminogenaktivator, 10 μ l fibrinmonomerer (60 μ g/ml) i 20 mM tris, pH 7,4/600 mM urea, 50 μ l plasminfritt plasminogen (med variabel sluttkonsentrasjon fra 0 til 6 μ M) inkuberes i 20 mM tris, pH 7,4, og 170 μ l 20 mM tris, pH 7,4/0,01 % "Tween" 80 ved 37 °C under røring.

(B) I andre r r inkuberes hhv. 100 μ l av det kromogene, plasminspesifikke substrat S 2251 (3 mM) i vann og 400 μ l 20 mM tris, pH 7,4/180 mM NaCl ved 37 °C.

Ved forskjellige tidspunkt tas 20 μ l ut fra (A) og overføres til et rør (B), inkuberes ytterligere 1 time ved

37 °C hvorefter reaksjonen stoppes med 300 μ l 1 M sitronsyre. Plasminet som dannes under inkubasjonen, vil spalte av peptidgruppen i det kromogene substrat S 2251 slik at p-nitroanilin frigis. p-nitroanilin måles fotometrisk ved 405 nm.

Konsentrasjonen av plasmin som dannes på denne måte, kan beregnes direkte fra en kalibreringskurve med rent plasmin fremstilt på tilsvarende måte.

De oppnådde resultater er fremstilt i figur 20 (v-PA β) og figur 21 (t-PA). Hastigheten v for dannelsen av plasmin er plottet mot plasminkonsentrasjonen.

Kinetikk for Glu-plasminogenaktivering med naturlig forekommende v-PA β + monomerer

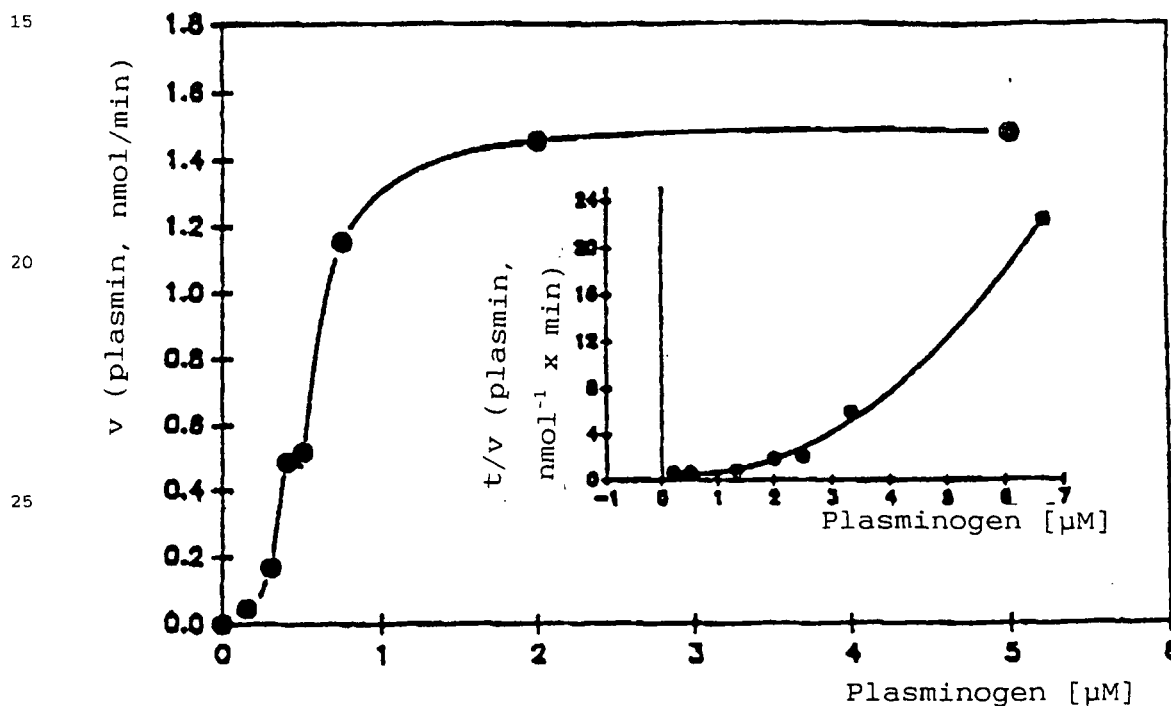


FIG. 20

Kinetikk for Glu-plasminogenaktivering med t-PA + monomerer

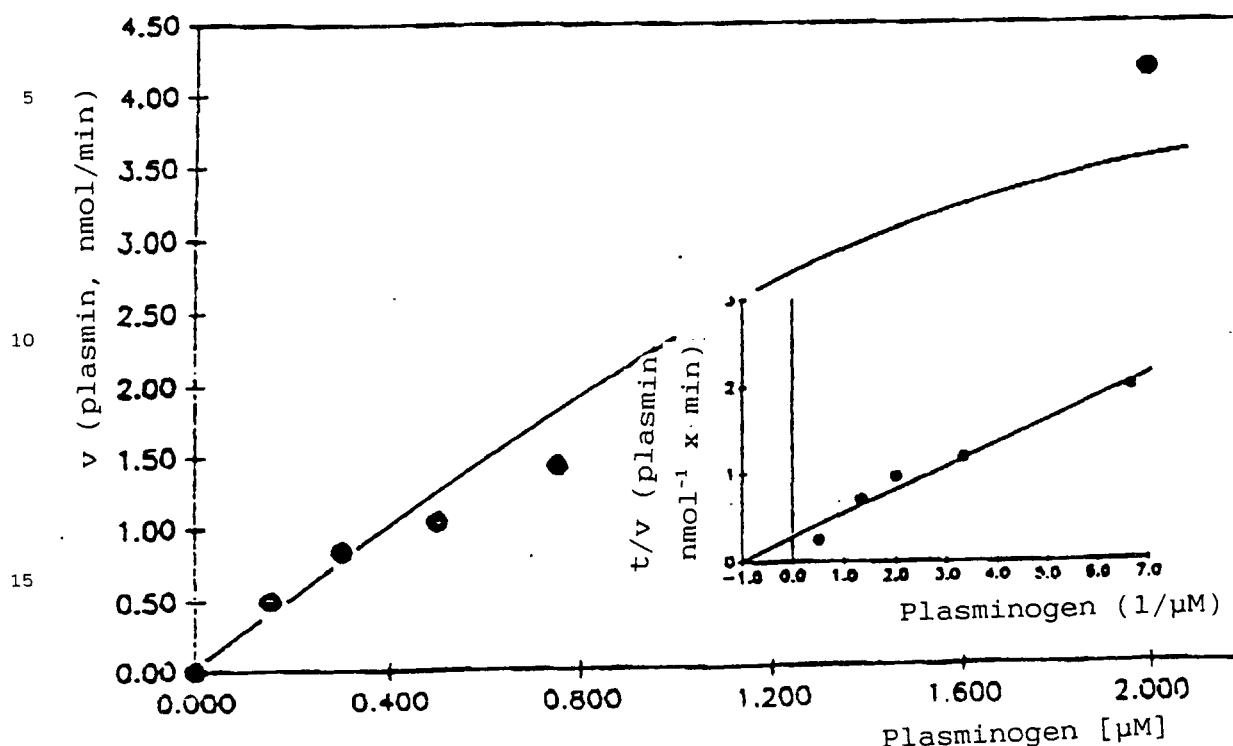


FIG. 21

Med t-PA oppnås typisk Michaelis-Menten-kinetikk. Når resultatene med t-PA overføres til et Lineweaver-Burk-plot (innskudd i figur 21), oppnås en rett linje.

Et fullstendig annet bilde oppnås når v-PA β -resultatene plottes. Plasminogenaktivatoren v-PA β viser en annen kinetisk oppførsel enn t-PA. Kurven følger ikke Michaelis-Menten-kinetikk, men snarere det typiske forløp for et allosterisk enzym; Lineweaver-Burk-plottet viser likeledes en kurve typisk for et allosterisk enzym (figur 20).

Plasminogenaktivatoren v-PA β er i motsetning til t-PA et allosterisk enzym.

Eksempel 13

Virkning av v-PA β i et rekonstituert koagellyseringssystem ("International Clot-Lysis Assay")

Renset humant fibrinogen koaguleres med trombin i nærvær av en konstant mengde humant plasminogen og forskjellige konsentrasjoner av plasminogenaktivator. I dette koagel

vil så plasminogen omdannes til plasmin ved hjelp av plasminogenaktivatorene; dette plasmin vil deretter oppløse det fibrøse stoff fibrin i koagelet. Tiden fra tilsetning av trombin til fullstendig lyse av koagelet måles og plottes dobbeltlogaritmisk mot plasminogenaktivator-konsentrasjonen. På denne måte undersøkes 12,5-100 μ l av en bufret løsning av det rensede aktive stoff og sammenlignes med 12,5-100 IU t-PA.

Resultatet er vist i figur 22.

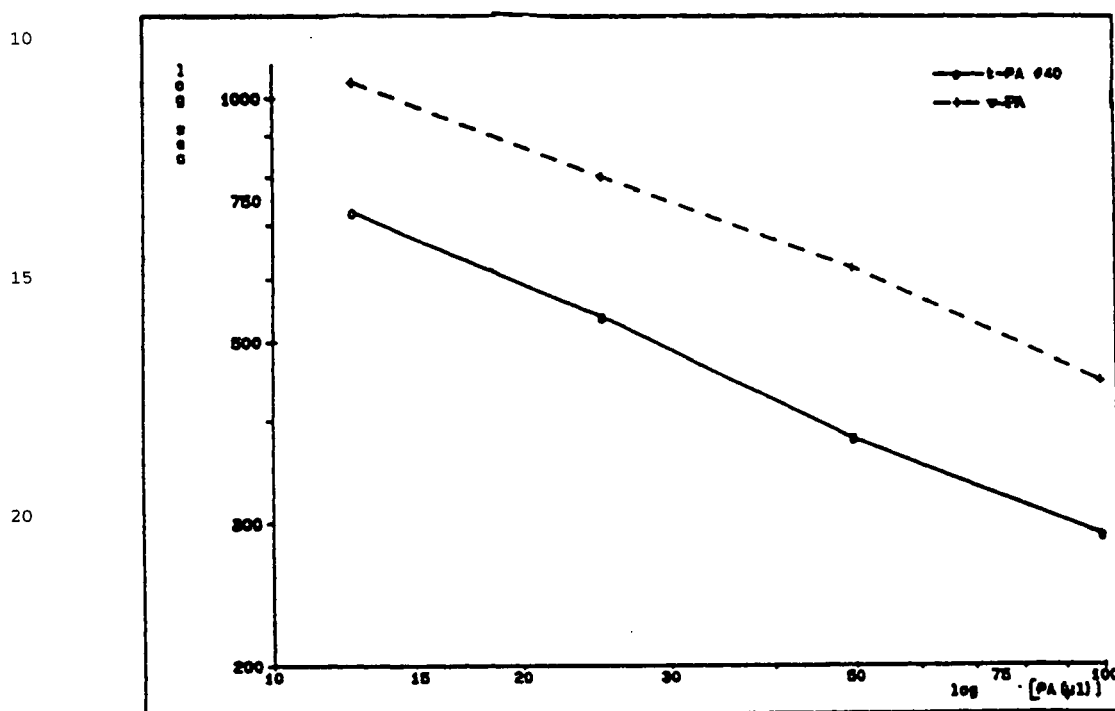


FIG. 22 "International Clot-Lysis Assay"

Det nye aktive stoff v-PA β gir i sammenligning med t-PA en parallell konsentrasjonseffektkurve. 100 μ l av en løsning av det rensede aktive stoff inneholder ifølge måleresultatene en aktivitet som tilsvarende 40 U t-PA.

Detaljert målemetode:

Frysetørket testtrombin (Behring, Marburg) løses i 1 ml destillert vann. Dette gir en aktivitet på 30 IU/ml. Humant plasminogen (Kabi, München) løses i 2 mM HCl + 50 % glyserol + 5 g/l PEG 6000. Dette gir en aktivitet på 10 IU/ml. Humant fibrinogen (Kabi, München) justeres til en konsentrasjon på 2 mg/ml koagulerbart protein i en fosfatbuffer med følgende sammensetning: 1,605 g/l KH_2PO_4 , 8,58 g/l Na_2HPO_4 .

2 H₂O, 100 l/l "Tween" 80, 500 mg/l HSA. Standard t-PA fortynnes til en aktivitet på 1000 IU/ml.

20 µl plasminogen + 100 µl trombin pipetteres i et reagensrør og inkuberes ved 37 °C. 1 ml fibrinogen og 12,5-
 5 100 µl plasminogenaktivator tilsettes samtidig, og en stoppeklokke startes. Etter 2 min plasseres en glasskule (6 mm i diameter) på koagelet. Når glasskulen har nådd bunnen av reagensrøret, stoppes klokken og tiden noteres.

10 Eksempel 14

Binding av v-PA β og t-PA til lysin-"Sepharose" 4B

Plasminogenaktivatorene bringes til de angitte pH-verdier og behandles under disse betingelser med lysin-"Sepharose". Lysin-"Sepharose" vaskes grundig, og aktiviteten
 15 bestemmes i de sammenslåtte supernatanter. Elueringsforsøk kunne ikke utføres med de små mengder v-PA.

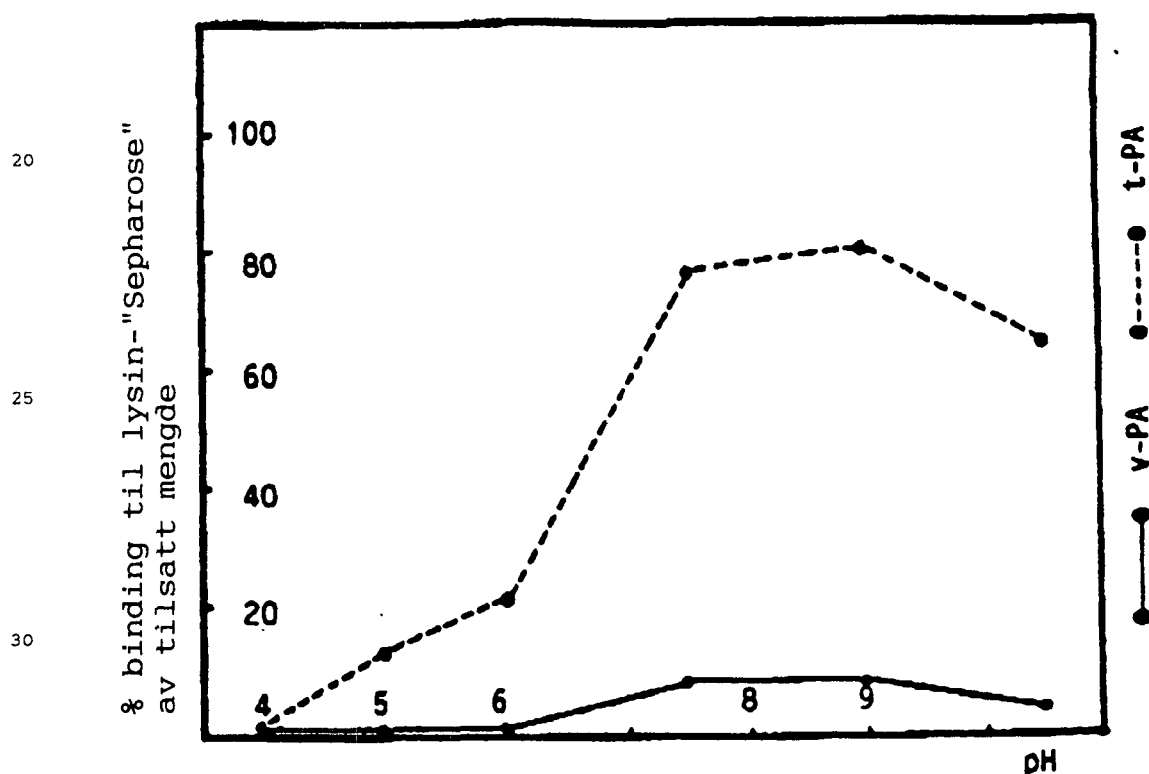


FIG. 23 Binding av v-PA β og t-PA til lysin-"Sepharose"

35

Eksempel 15

Kaseinolyse med v-PA β og t-PA

Aktiviteten av plasminogenaktivatorer kan bestemmes ved hjelp av den såkalte fibrinplatetesten (Astrup, T. og

Müllertz i Arch. Biochem. Biophys. 40:346-351, 1952). Plasminogenaktivatoren inkuberes i utstemplede hull i platen ved 37 °C. Når plasminogen er til stede, vil det dannede plasmin lysere fibrin, og en lysering dannes med en diameter som avhenger av konsentrasjonen av plasminogenaktivator som er benyttet. Det ventes av en fibrinspesifikk plasminogenaktivator at den ikke angriper andre proteiner enn fibrin. Dette kan undersøkes ved metoden som her beskrives, hvor fibrin er erstattet med kasein og plasminogen (figur 24).

Fibrinspesifisitet av v-PA og t-PA

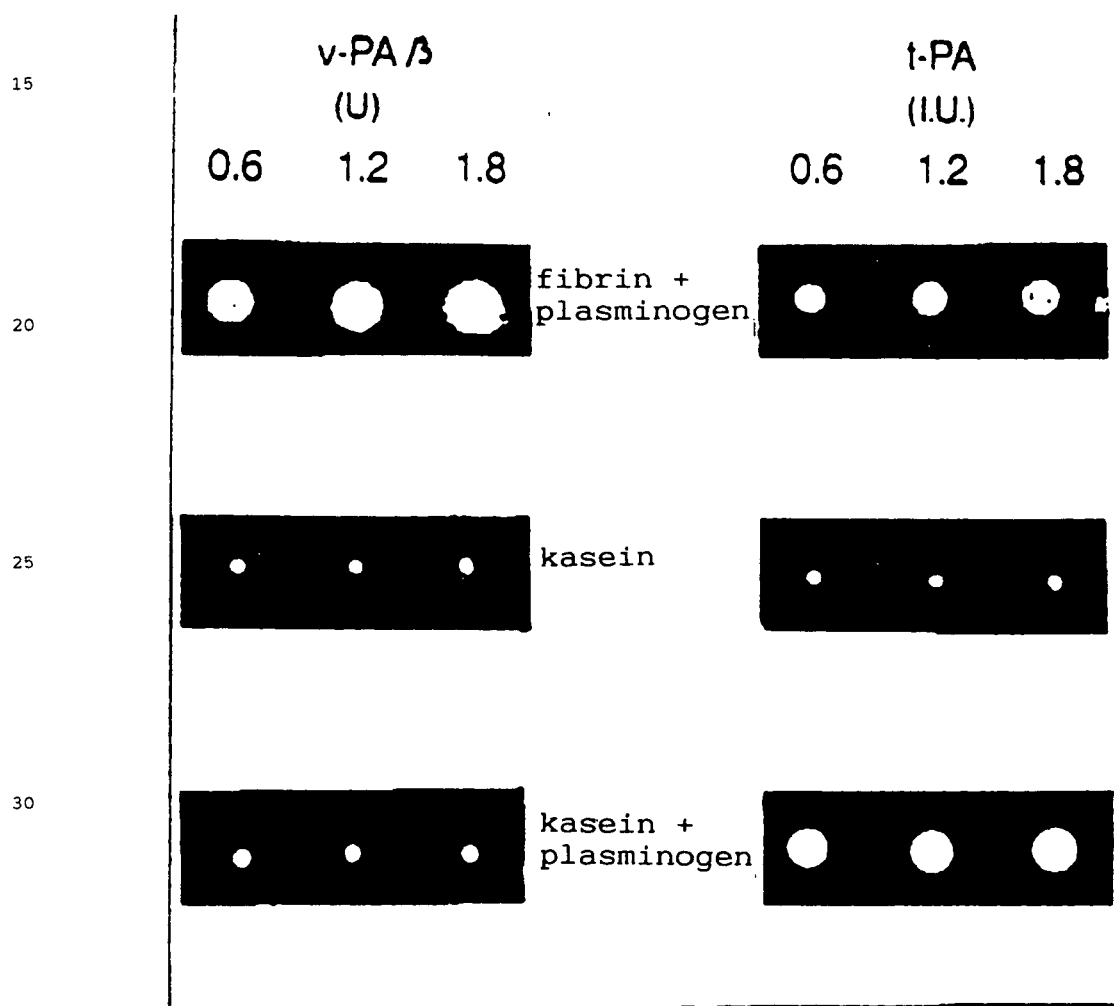


FIG. 24 Måling av fibrinspesifisiteten av v-PA β sammenlignet med t-PA

Som vist i figur 24 gir v-PA β i motsetning til t-PA overhodet ikke lysringer på plasminogenholdige kaseinplater. Dette viser den absolutte fibrinspesifisitet av v-PA β .

5 Eksempel 16

Bestemmelse av Km-verdien for en rekke amidolytiske substrater med plasminogenaktivatorene t-PA, urokinase og de aktive former av v-PA α_1 og v-PA β

- 90 μ l 100 mM tris, pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,01 %
 10 "Tween" 80 og 50 μ l av det angitte kromogene substrat (alt fra Kabi Vitrum, Stockholm, Sverige) i sluttkonsentrasjoner på 0,03, 0,06, 0,1, 0,3, 0,6 og 1 mM inkuberes med 10 μ l (3 enheter pr. brønn) av den angitte plasminogenaktivator ved 37 °C i en 96-brønners mikrotiterplate. Frisatt p-nitroanilin bestemmes fotometrisk ved 405 nm ved forskjellige tidspunkt
 15 mellom 0 og 7 timer. Resultatene evalueres ved hjelp av et Lineweaver-Burk-plot, og Km-verdien bestemmes (Segel, I.H., Enzyme Kinetics, John Wiley and Sons, New York). Følgende kromogene substrater ble benyttet:

20

H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251)

H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (S-2288)

< Glu-Gly-Arg-pNA (S-2444)

25

Følgende Km-verdier (mmol/l) ble bestemt:

30

Plasminogenaktivator	S-2288	S-2444
t-PA	0,7 (1,0)	2,0
Urokinase	0,4 (0,2)	0,1 (0,09)
v-PA α_1	1,0	2,0
v-PA β	2,0	2,0

35

Verdiene angitt i parenteser er tatt fra litteraturen (Friedberger, P. i Scand. I. Clin. Lab. Invest. 42 - Supplement 1.62, 1982).

De aktive stoffer v-PA α_1 og v-PA β viser lignende

Km-verdier som t-PA. v-PA α_1 , v-PA β og t-PA reagerer overhodet ikke med det kromogene substrat S-2251.

Eksempel 17

5 Isolering og karakterisering av cDNA-kloner med segmenter for plasminogenaktivatorer fra spyttkjertel fra vampyrflaggermusen *Desmodus rotundus*

1. Fremstilling av et cDNA-bibliotek

10 Total-RNA fra spyttkjertler fra *Desmodus rotundus* isoleres ved hjelp av guanidinisotiocyanatmetoden [Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., Rutter, W.J., Biochemistry 18:5294-5299 (1979)]. 25 μ g poly A⁺-RNA isoleres fra 500 μ g total-RNA ved oligo(dt)-celluloseaffinitetskromatografi
15 [Aviv, H., Leder, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:1408-1412 (1972)].

cdDNA-syntese foretas i henhold til Gubler og Hoffmans metode [Gubler, U., Hoffman, B., Gene 25:263-269 (1983)] ved hjelp av "cdDNA Synthex Kit" fra Pharmacia LKB Biotechnology
20 AB. De individuelle trinn foretas i henhold til den fremgangsmåte produsenten angir. Dobbeltttrådet cdDNA utstyrt med EcoRI-adaptore (/mikrogram) kobles til EcoRI-kuttet, defosforylert lambda gt 10 fagvektor (4 μ g) ved hjelp av T4-DNA-ligase [Huynh, T.V., Young, A., Davis, R.W. i Practical Approaches in
25 Biochemistry. DNA Cloning, Volum 1, red. Glown, D.M., IRL Oxford, Washington, DC (1985)]. Ligeringsblandingen pakkes til infeksjøs fager ved hjelp av pakkeekstrakter (Gigapack II Gold pakkeekstrakt fra Stratagene, La Jolla, USA) i henhold til de metoder produsenten angir. Det oppnådde cdDNA-bibliotek
30 inneholder 1×10^6 rekombinante lambda-fag.

2. Screening av cdDNA-biblioteket med en ³²P-merket sekvens fra genet for human vevsspesifikk plasminogenaktivator (t-PA)

35 En t-PA cdDNA-sekvens [Fisher, R., Waller, E.K., Grossi, G., Thompson, D., Tizard, R. og Schleuning, W.-D., J. Biol. Chem. 260:11223-11230 (1985)], radioaktivt merket ved nick-translasjon [Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.,

Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982)] benyttes som probe for identifisering av cDNA for plasminogenaktivator fra vampyrflaggermus-spytt. DNA fra totalt 50000 rekombinante lambda-fager over-
5 føres til "Replika"-membraner (Gene Screen Plus, varemerke tilhørende Du Pont de Nemours, NEN Research Products).

Behandling av membranene og sammensetning av hybridiseringsløsningene tilsvare data angitt av produsenten. Hybridiserings- og vasketemperaturen er 42 °C. Siste vasketrinn
10 finner sted i en 4 x SSC-buffer. Fra 50000 screenede rekombinante fager ble 11 positive kloner isolert.

3. Karakterisering av cDNA fra de positive kloner

cDNA-innskuddet fra de positive kloner subklones i
15 henhold til gjengse fremgangsmåter inn i de kommersielt tilgjengelige sekvenseringsvektorer M13mp18 og M13mp19 [Messing, J., Meth. Enzymol. 101:20-769 (1983)] og sekvenseres ifølge dideoksynukleotidmetoden [Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467 (1977)]. Sammen-
20 ligning av nukleotidsekvenser fra de enkelte kloner med nukleotidsekvensen fra cDNA-genet for humant t-PA [Pennica, D., Holmes, W.E., Kohr, W.J., Harkins, R.N., Vehar, G.A., Ward, C.A., Bennet, W.F., Yelverton, E., Seeburg, P.H., Heyneker, H.L. og Goeddel, D.V., Nature 303:214-221 (1983)] viser høy
25 grad av sekvensidentitet (>80 %). Videre viser de utledede proteinsekvenser stor grad av sekvensidentitet med deler av det humane t-PA (>70 %). Ingen av klonene inneholder cDNA for det komplette plasminogenaktivatorgenet fra vampyrflaggermus. Delsekvenser fra en av disse kloner nyttes som probe for scre-
30 ening av nok et cDNA-bibliotek fra spyttkjertler fra *Desmodus rotundus* (eksempel 18).

Eksempel 18

Isolering, karakterisering og sekvensering av fullstendige cDNA-kloner for plasminogenaktivatorer fra spyttkjertel fra *Desmodus rotundus*

5

1. Fremstilling av et cDNA-bibliotek fra spyttkjertel-RNA fra *Desmodus rotundus*

Total-RNA isoleres fra spyttkjertler fra vampyr-flaggermus (*D. rotundus*) ved oppslutning med guanidinisotiocyanat og påfølgende ultrasentrifugering ved hjelp av en cesiumkloridpute (1).

80 µg poly A⁺-RNA isoleres fra 3 mg frysetørket total-RNA ved to gangers affinitetskromatografi over oligo-deoksythymidincellulose (2, 3). 5 µg av dette preparat benyttes til cDNA-syntese i henhold til Gubler og Hoffmans metode (4) med en rekke modifikasjoner ("ZAP-cDNA" syntese-kit, Stratagene) (5, 6). Syntese av første tråd initieres ved hjelp av et oligonukleotid som inneholder et oligo-deoksythymidin-stykke og gjenkjenningssekvensen for restriksjonsendonukleasen XhoI (6), og utføres med revers transskriptase fra Moloney museleukemivirus ved hjelp av 5-metyldeoksytydin. Annen tråd syntetiseres med *E. coli* DNA-polymerase I i nærvær av *E. coli* ribonuklease H. Endene på det slik dannede, dobbelttrådede cDNA gjøres butte med T4 DNA-polymerase og kobles så til EcoRI-adaptore ved hjelp av T4 DNA-ligase. Endene fosforyleres så ved hjelp av T4 polynukleotidkinase. Etter oppslutning av cDNA med restriksjonsenzymet XhoI gelfiltreres produktet over "Sepharose" CL-4B (Pharmacia). Fraksjoner som inneholder cDNA med en minimal størrelse på 500 basepar slås sammen, utbyttet er tilnærmet 1,2 µg cDNA. En tredjedel av dette kobles til 3 µg EcoRI-XhoI-oppsluttete, defosforylerte armer fra bakteriofagvektoren Uni-ZAP(TM)XR fra selskapet Stratagene (La Jolla, USA) (5, 7). Ligeringsblandingen pakkes i 7 uavhengige porsjoner ved hjelp av "Gigapack" II Gold pakkeekstrakter (Stratagene) (8). På denne måte oppnås et primært cDNA-bibliotek med mer enn 4×10^6 rekombinante lambda-bakteriofager.

2. Identifisering av cDNA-kloner for plasminogenakti-
vatorer fra spytt fra vampyrflaggermusen *Desmodus*
rotundus

Proben som benyttes for identifisering av full-
5 stendige cDNA-kloner, er et 76 basepars DNA-fragment produsert
ved oppslutning med restriksjonsenzymene AluI og BamHI
(nukleotid 141-216 i figur 26c) fra 5'-enden av en klon iso-
lert fra det første cDNA-bibliotek (se eksempel 17). Dette
fragment merkes radioaktivt ved nick-translasjon (9) i nærvær
10 av (α -³²P] deoksyadenosintrifosfat og benyttes til hybridi-
sering av replikafiltre på hvilke DNA fra i alt $1,2 \times 10^5$ re-
kombinante bakteriofager fra det primære cDNA-bibliotek har
blitt immobilisert (10). Hybridiserings- og vasketemperaturen
er 50 °C. Det avsluttende vasketrinn finner sted i 2 x SSC-
15 buffer (10). 50 kloner av mer enn 200 kloner som viste signal
ved autoradiografi av "Replika"-filtrene, renses ved indi-
viduell utplating og gjentakelse av plakkfilterhybridiseringen
beskrevet ovenfor. På denne måte isoleres 38 kloner som også
ved den andre screening gav klart positive signaler.

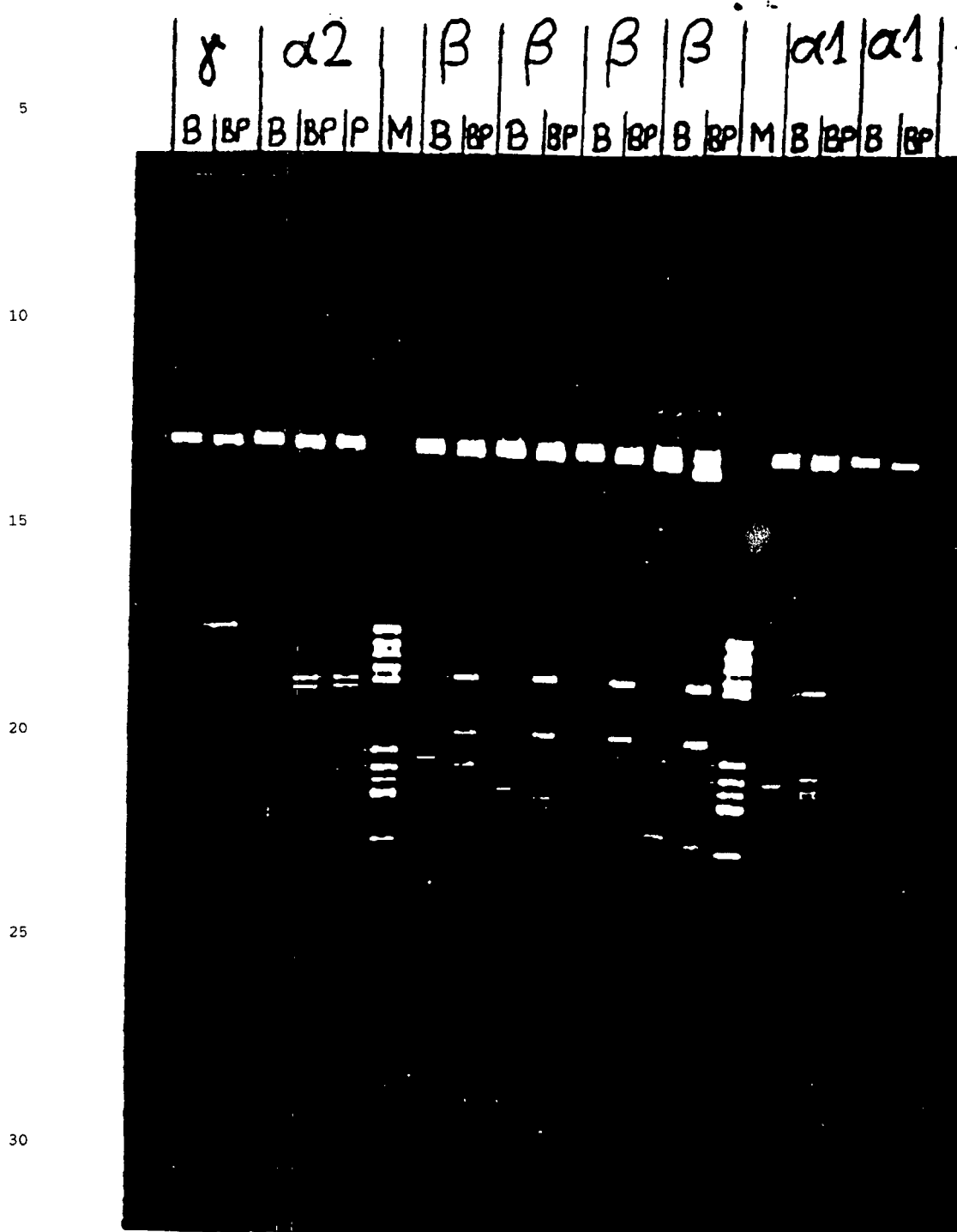
20

3. Karakterisering og sekvensering av cDNA-klonene

Plasmidet pBluescript SK, som inngår i de isolerte
positive UnitZAP(TM)XR-bakteriofagklonene, og som omfatter
cDNA-fragmentet som er integrert i den samme del av bakterio-
25 fagen, fjernes fra bakteriofagen ved såkalt "in vivo eksisjon"
(7, 14). Slik oppnås i alt 35 forskjellige pBluescript SK
plasmidkloner som stammer fra de positive bakteriofagkloner.
Plasmidene isoleres i henhold til Birnboim og Doly's metode
(11), og deres cDNA-del deles inn i fire forskjellige klasser
30 α_1 , α_2 , β , γ , i henhold til restriksjonsanalyse med enzymene
BamHI og PstI (figur 25) og DNA-sekvensering av 5'-endene.
cDNA-delen av de lengste cDNA-klonene fra alle fire klasser
subklones inn i bakteriofagvektoren M13mp19 (12) og sekven-
seres ved dideoksynukleotidmetoden ifølge Sanger ("Sequenase"-
35 kit, United States Biochemical Corporation, Cleveland, USA)
(13, 15), delvis ved å benytte oligonukleotidprimere som syn-
tetiseres spesifikt for dette formål og som er komplementære
til sekvenser av cDNA-delen. De komplette cDNA-sekvenser

(inklusive en kort bit av poly A-kjedene til stede i 3'-enden) og proteinsekvenser utledet av disse er vist i figurene 26a, b, c og d.

- 5 1. Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J.,
Rutter, W.J., *Biochemistry* 18, 5294-5299 (1979).
2. Schwab, M., Alitalo, K., Varmus, M.E., Bishop, J.M.,
Nature 303, 497-501 (1983).
3. Pharmacia LKB Biotechnology AB, mRNA Purification Kit
10 - Instructions, 1-16 (år ikke oppgitt).
4. Gubler, U., Hoffman, B., *Gene* 25, 263-269 (1983).
5. Huse, W.D., Hansen, C., *Strategies* 1, 1-3 (1989).
6. Firma Stratagene, ZAP-cDNA-(TM)XR Synthesis Kit -
Instruction Manual, 1-21 (1989).
- 15 7. Firma Stratagene, Uni-ZAP(TM)XR Cloning Kit -
Instruction Manual, 1-11 (1989).
8. Firma Stratagene, Gigapack II Gold Packaging
Extract - Instruction Manual, 1-5 (1989).
9. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., *Molecular*
20 *Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor
Laboratory, New York (1982)).
10. Du Pont de Nemours, NEN Research Products,
Colony/PlaqueScreen, Hybridization Transfer
Membrane - Directions, 1-11 (ikke noe år).
- 25 11. Birnboim, H.C., Doly, J., *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-
1523 (1979).
12. Messing, J., *Meth. Enzymol.* 101, 20-769 (1983).
13. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., *Proc. Natl.*
Acad. Sci. USA 74:5463-5467 (1977).
- 30 14. Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.M., Huse,
W.D., *Nucleic Acids Res.* 16, 7583-7600 (1988).
15. United States Biochemical Corporation, Step-By-Step
Protocols For DNA Sequencing with Sequenase Version
2.0, 1-21 (1988).



35 FIG. 25

Restriksjonsmønster for utvalgte pBluescript SK plasmidkloner med de lengste cDNA-deler fra hver av de fire grupper alfa 1 (2 plasmidkloner), alfa 2 (1 plasmidklon), beta (4 plasmidkloner) og gamma (1 plasmidklon).

Etter oppslutning med restriksjonsenzymene BamHI ("B"), PstI ("P") eller en blanding av disse to restriksjons-
enzymer ("BP") ble plasmid-DNA-preparatene separert på en
1,8 % agarosegel. Målestokken for størrelse utgjøres av
5 plasmid pBR322 ("M", DNA-molekylvektsmarkør 5 fra selskapet
Boehringer-Mannheim) oppsluttet med restriksjonsenzymet
HaeIII. Størrelsen på de klart synlige fragmenter er 587, 540,
504, 458, 434, 267, 234, 213, 192 til 184 og 123 basepar (fra
toppen mot bunnen). Agarosegelen ble farget med etidiumbromid
10 etter elektroforesen og fotografert. Fra gruppene alfa 1 og
beta ble klonene til venstre på bildet sekvensert.

15

20

25

30

35

1 GGCGCTGAAGCCCTGCAAGAGCTGAGCTGACGGGAAATCCTCTCCAGGAGAGAAGGAAGG 60
 61 CAAGGAGTGGCGAGTTTAAGGGACACCGCAGAAATGGTGAATACAATGAAGACAAAGCTG 120
 M V N T M K T K L
 5 121 TTGTGTGTACTGCTGCTTTGTGGAGCAGTCTTCTCGTTGCCAGGCAGGAAACCTACAGG 180
 L C V L L L C G A V F S L P R Q E T Y R
 181 CAATTGGCAAGGGGATCCAGAGCATATGGTGTGGCCTGCAAAGACGAAATAACCCAGATG 240
 Q L A R G S R A Y G V A C K D E I T Q M
 241 ACATACCGGCGACAAGAGTCGTGGCTGCGCCCCGAGGTCAGAAGCAAGCGGGTGGAAACAC 300
 T Y R R Q E S W L R P E V R S K R V E H
 10 301 TGCCAGTGCATAGAGGCCAGGCCCCGGTGCCACACCGTGCCCGTCAACAGTTGCAGTGAA 360
 C Q C D R G Q A R C H T V P V N S C S E
 361 CCAAGGTGCTTCAATGGGGGGACATGCTGGCAGGCTGTATATTTCTCAGACTTTGTCTGT 420
 P R C F N G G T C W Q A V Y F S D F V C
 421 CAGTGCCCTGCAGGATATACGGGGAAACGGTGTGAAGTAGATACCCGTGCCACCTGCTAT 480
 Q C P A G Y T G K R C E V D T R A T C Y
 15 481 GAGGGCCAGGGTGTACCTACAGGGGCACATGGAGCACAGCAGAAAGTAGGGTTGAGTGT 540
 E G Q G V T Y R G T W S T A E S R V E C
 541 ATCAACTGGAACAGCAGCCTTCTGACCCGGAGGACCTACAATGGGCGGATGCCAGATGCC 600
 I N W N S S L L T R R T Y N G R M P D A
 601 TTCAACCTGGGCCTTGGGAATCACAATTACTGCAGAAACCCAAATGGAGCCCCAAACCT 660
 F N L G L G N H N Y C R N P N G A P K P
 661 TGGTGTCTATGTCATCAAGGCAGGGAAGTTACCTCGGAGTCCTGTAGCGTGCTGTCTGC 720
 W C Y V I K A G K F T S E S C S V P V C
 20 721 TCCAAGGCCACCTGTGGCCTGAGAAAGTACAAGGAGCCACAGCTTCACAGTACAGGAGGA 780
 S K A T C G L R K Y K E P Q L H S T G G
 781 CTCTTCACAGACATCACCTCTCATCCATGGCAGGCTGCCATCTTTGCCCAGAACAGAAGG 840
 L F T D I T S H P W Q A A I F A Q N R R
 841 TCATCAGGAGAAAGGTTCTTGTGTGGGGGATATTGATCAGTTCCTGCTGGGTCTGACT 900
 S S G E R F L C G G I L I S S C W V L T
 25 901 GCTGCCCCTGCTTCCAGGAGAGCTATCTTCTGACCAGCTTAAGGTGGTTTTGGGCAGA 960
 A A H C F Q E S Y L P D Q L K V V L G R
 961 ACATACCGGGTGAACCTGGAGAGGAAGAGCAGACATTTAAAGTCAAAAAATACATCGTC 1020
 T Y R V K P G E E E Q T F K V K K Y I V
 1021 CATAAGGAATTTGATGACGACACTTACAACAATGACATTGCACTGCTGCAGCTGAAATCG 1080
 H K E F D D D T Y N N D I A L L Q L K S
 30 1081 GACTCACCACAGTGTGCCCAAGAGAGTGACAGTGTCCGCGCCATCTGTCTCCCGGAAGCC 1140
 D S P Q C A Q E S D S V R A I C L P E A
 1141 AACCTGCAGCTGCCCAGTGGACAGAATGTGAGCTGTCTGGCTACGGCAAGCATAAGTCA 1200
 N L Q L P D W T E C E L S G Y G K H K S
 1201 TCTTCTCCTTTCTATTCTGAGCAGCTGAAGGAAGGGCATGTCAGGCTGTACCCCTCCAGC 1260
 S S P F Y S E Q L K E G H V R L Y P S S

1261	CGCTGCGCACCCAAGTTTCTGTTTAAACAAAACCGTCACAAACAACA..CTGTGTGCTCGA	1320
	R C A P K F L F N K T V T N N M L C A G	
1321	GACACGCGGAGCGGAGAGATCTATCCAAATGTGCACGATGCCTGCCAGGGTGACTCAGGA	1380
5	D T R S G E I Y P N V H D A C Q G D S G	
1381	GGCCCCCTGGTGTGTATGAATGACAACCACATGACTTTGCTTGGCATCATCAGTTGGGGT	1440
	G P L V C M N D N H M T L L G I I S W G	
1441	GTTGGCTGTGGGGAGAAAGACGTTCCAGGTGTATACACCAAGGTTACTAATTACCTAGGC	1500
	V G C G E K D V P G V Y T K V T N Y L G	
1501	TGGATTGAGACAACATGCACCTGTAACCAAGAACACACAACCTCCCTGGCAGCCCCCTGCC	1560
10	W I R D N M H L	
1561	TTCCTCCAGCCCAGAAGAAACACAAGGCAGAATGCTTCCTGACACCAGTTTCTCCACAAG	1620
1621	CCTGCACACAGTACTAGTGGGGGGAGAACGTATAGGAGAGGGGAGAGGGTATACTTCCAC	1680
1681	AGGTACTTCCCACCTTCATAAGTTTTTCAGGGGATAAGGTCTGATTTAGAATCCATTTCTGT	1740
1741	CAGACAAGAAGACAGATAAAATGCCAACCCCTCCCAGAACACCACCATCTAGGGCAGACAA	1800
1801	GAGGTAGAATAAAAAGCCCCAACCTCCTAATCTGTCAACATGAGCAGCTTTGGAAATGGGAC	1860
15	1861 CACCAAGATGAAAGTATCTTTCTAGTAAAAAATAGCTAGATCCTTCAGTAAAGAAGTATC	1920
1921	ACATTAGAAAATAAAATGTCCATGTATAGTCACAAGGACGCCAACAGCGACCTGGGCCTC	1980
1981	CTAACAAGGAATGGGCTGTCTGGCCAGATTGCGTTTCCTCAGGCCATCCTTTAAGTATTTG	2040
2041	ACTATCCTCTTTCTACAGCTCTTGGAAGGAATTCCTTTTGTGTACAGTATAAATCTTTTT	2100
2101	CCTTTATAAACTTTTATAGTAGAAGAACTGTATCATTCTGATAACTGCTAAACTAGGCTTT	2160
20	2161 AGCATTTTGTATCAATCCATTGTAGTTGCCACGACTCTGTATTATACTACACTGGAAAA	2220
2221	ATAAATTCAGGCATATTTTTCACTTAAAAAAA 2252	

FIG. 26a

25

30

35

1 GCCCTGCAAGAGCTGAGCTGACGGGAAATCCTCTCCAGGAGAGAAGGAAGGCAAGGAGTG 60
61 GCGAGTTTAAGGGACACCGCAGAAATGGTGAATACAATGAAGACAAAGCTGTTGTGTGTA 120
M V N T M K T K L L C V
5 121 CTGCTGCTTTGTGGAGCAGTCTTCTCGTTGCCAGGCAGGAAACCTACAGGCAATTGGCA 180
L L L C G A V F S L P R Q E T Y R Q L A
181 AGGGGATCCAGAGCATATGGTGTGGCCTGCAGAGACGAAAAACCCAGATGATATACCAG 240
R G S R A Y G V A C R D E K T Q M I Y Q
241 CAACAAGAGTCGTGGCTGCGCCCCGAGGTGAGAAGCAAGCGGGTAGAACACTGCCGGTGC 300
Q Q E S W L R P E V R S K R V E H C R C
10 301 GATAGAGGATTGGCCAGTGTACACCGTGCCTGTCAAAAGTTGCAGTGAAGTGAAGTGC 360
D R G L A Q C H T V P V K S C S E L R C
361 TTCAATGGGGGACATGCTGGCAGGCTGCATCTTTCTCAGACTTTGTCTGTCTGCTGCTG 420
F N G G T C W Q A A S F S D F V C Q C P
421 AAAGGATATACGGGGAAACAGTGTGAAGTAGATACCCATGCCACCTGCTACAAGGACCAG 480
K G Y T G K Q C E V D T H A T C Y K D Q
15 481 GGTGTCACCTACAGGGGCACATGGAGCACATCGGAAAGTGGGGCTCAGTGTATCAACTGG 540
G V T Y R G T W S T S E S G A Q C I N W
541 AACAGCAACCTTCTGACCCGGAGGACCTACAATGGGCGGAGGTGAGATGCCATCACACTG 600
N S N L L T R R T Y N G R R S D A I T L
601 GGCCTTGGGAATCACAATTACTGCAGAAACCCAGATAACAACCTCAAACCTTGGTGCTAT 660
G L G N H N Y C R N P D N N S K P W C Y
661 GTCATCAAGGCAAGCAAGTTCATCTTGGAGTTCTGTAGCGTGCCTGTCTGCTCCAAGGCC 720
V I K A S K F I L E F C S V P V C S K A
20 721 ACCTGTGGCCTGAGAAAGTACAAGGAGCCACAGCTTACAGTACAGGAGGACTCTTCACA 780
T C G L R K Y K E P Q L H S T G G L F T
781 GACATCACCTCTCATCCATGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAGAACAGAAGGTGATCAGGA 840
D I T S H P W Q A A I F A Q N R R S S G
841 GAAAGGTTCTTGTGTGGGGGATATTGATCAGTTCCTGCTGGGTCTGACTGCTGCCAC 900
E R F L C G G I L I S S C W V L T A A H
25 901 TGCTTCCAGGAGAGGTATCCTCCCCAGCATCTTAGGGTGGTTTTGGGCAGAACATACCGG 960
C F Q E R Y P P Q H L R V V L G R T Y R
961 GTGAAACCTGGAAAGGAAGAGCAGACATTTGAAGTCGAAAAATGCATCGTCCATGAGGAA 1020
V K P G K E E Q T F E V E K C I V H E E
1021 TTTGATGACGACACTTACAACAATGACATTGCACTGCTGCAGCTGAAATCGGGCTCGCCA 1080
F D D D T Y N N D I A L L Q L K S G S P
30 1081 CAGTGTGCCCAAGAGAGTGACAGTGTCCGCGCCATCTGTCTCCCGAAGCCAACCTGCAG 1140
Q C A Q E S D S V R A I C L P E A N L Q
1141 CTGCCCAGTGGACAGAATGTGAGCTGTCTGGCTACGGCAAGCATAAGTCGTCTTCTCCT 1200
L P D W T E C E L S G Y G K H K S S S P
1201 TTCTATTCTGAGCAGCTGAAGGAAGGGCATGTCAGGCTGTACCCCTCCAGCCGCTGCACA 1260
F Y S E Q L K E G H V R L Y P S S R C T

1261	TCGAAGTTTCTGTTTAAACAAACCGTCACAAACAACATGCTGTGTG(	CGAGACACGCGG	1320
	S K F L F N K T V T N N M L C A G D T R		
1321	AGCGGAGAGATCTATCCAAATGTGCACGATGCCTGCCAGGGTGACTCAGGAGGCCCTTG		1380
	S G E I Y P N V H D A C Q G D S G G P L		
5 1381	GTGTGTATGAATGACAACCACATGACTTTGCTTGGCATCATCAGTTGGGGTGTGGCTGT		1440
	V C M N D N H M T L L G I I S W G V G C		
1441	GGGGAGAAAGACATTCCAGGTGTATACACCAAGGTTACTAATTACCTAGGCTGGATTCTGA		1500
	G E K D I P G V Y T K V T N Y L G W I R		
1501	GACAACATGCGCCCATACCAAGAACACGCAACTCCCTGGCAGCCCCCTGCCTTCCTCCAC		1560
	D N M R P		
10 1561	CCCAGAAGAAACACAAGGCAGAATGCTTCCTGACACCAGTTTCTCCACAAGCCTGCACAC		1620
	AGTACTAGTGGGGGAGAACGTATAGGAGAGGGGAAAGGGTGTACTTCCACAGGTACTTC		1680
1681	CCACTTCATAAGTTTTTCAGGGGATAAGGTCTGATTTAGAATCCATTTCTGTCAGACAAGA		1740
1741	AGACAGATAAATGCCAACCCTCCCAGAACACCACCATCTAGGGCAGACAAGAGGTAGAA		1800
1801	TAAAAGCCCAACCTCCTAATCTGTCAACGTGAGCAGCTTTGGAAATGGGACCACCAAGAT		1860
15 1861	GAAAGTATCTTTCTAGTAAAAAATAGCTAGATCCTTCAGTAAAGAAGTATCACATTAGAA		1920
	ATAAAATGTCCATGTATAGTCACAAGGACACCCAACAGCGACCTGGGCCTCCTAACAAAGG		1980
1981	AATGGGCTGTCTGGCCAGATTGCGTTCCTCAGGCCATCCTTTAAGTATTTGACTACCCCC		2040
2041	TTTCTACAGCTTTTGGGAAGGAATTCCTTTTGTGTACAGTATAAAATCTTTTCTTTTATAA		2100
2101	ACTTTATAGTAGAAGAACTGTATCATTCTGATAACTGCTAAACTAGGCTTTAGCATTTTG		2160
20 2161	ATATCAATCCATTGTAGTTGCCACAACCTCTGTATTATACTACACTGGAAAAATAAATTCA		2220
2221	GGCATATTTTTCACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2257	

FIG. 26b

25

30

35

1 GGCCAAGGCTGTGCGGAGAGATTGGCGCTGAAGCCCTGCAAGAGCTGAGCTGACGGGAAA 60
 61 TCCTCTCCAGGAGAGAAGGAAGGCAAGGAGTGGCGAGTTTAAGGGACACCGCAGAAATGG 120
 M V
 5 121 TGAATACAATGAAGACAAAGCTGTTGTGTGTACTGCTGCTTTGTGGAGCAGTCTTCTCGT 180
 N T M K T K L L C V L L L C G A V F S L
 181 TGCCCAGGCAGGAAACCTACAGGCAATTGGCAAGGGGATCCAGAGCATATGGTGGTTGCA 240
 P R Q E T Y R Q L A R G S R A Y G G C S
 241 GTGAACTGAGGTGCTTCAATGGGGGGACATGCTGGCAGGCTGCATCTTTCTCAGACTTTG 300
 E L R C F N G G T C W Q A A S F S D F V
 10 301 TCTGTCAAGTGCCTTAAAGGATATACGGGGAAACAGTGTGAAGTAGATACCCATGCCACCT 360
 C Q C P K G Y T G K Q C E V D T H A T C
 361 GCTACAAGGACCAGGGTGTACCTACAGGGGCACATGGAGCACATCGGAAAGTGGGGCTC 420
 Y K D Q G V T Y R G T W S T S E S G A Q
 421 AGTGTATCAACTGGAACAGCAACCTTCTGACCCGGAGGACCTACAATGGGCGGAGGTGAG 480
 C I N W N S N L L T R R T Y N G R R S D
 15 481 ATGCCATCACACTGGGCCTTGGGAATCACAATTACTGCAGAAACCCAGATAACAACCTCAA 540
 A I T L G L G N H N Y C R N P D N N S K
 541 AACCTTGGTGTCTATGTCTCATCAAGGCAAGCAAGTTCATCTTGGAGTTCTGTAGCGTGCCTG 600
 P W C Y V I K A S K F I L E F C S V P V
 601 TCTGCTCCAAGGCCACCTGTGGCCTGAGAAAGTACAAGGAGCCACAGCTTCACAGTACAG 660
 C S K A T C G L R K Y K E P Q L H S T G
 661 GAGGACTCTTCACAGACATCACCTCTCATCCATGGCAGGCTGCCATCTTTGCCCAGAACA 720
 20 G L F T D I T S H P W Q A A I F A Q N R
 721 GAAGGTCATCAGGAGAAAGGTTCTTGTGTGGGGGATATTGATCAGTTCCTGCTGGGTCC 780
 R S S G E R F L C G G I L I S S C W V L
 781 TGAAGTGTGCCCCACTGCTTCCAGGAGAGGTATCCTCCCCAGCATCTTAGGGTGGTTTTGG 840
 T A A H C F Q E R Y P P Q H L R V V L G
 841 GCAGAACATACCGGGTGAAACCTGGAAGGAGAGCAGACATTTGAAGTCGAAAAATGCA 900
 25 R T Y R V K P G K E E Q T F E V E K C I
 901 TCATCCATGAGGAATTTGATGACGACACTTACAACAATGACATTGCACTGCTGCAGCTGA 960
 I H E E F D D D T Y N N D I A L L Q L K
 961 AATCGGGCTCGCCACAGTGTGCCCAAGAGAGTGACAGTGTCCGCGCCATCTGTCTCCCGG 1020
 S G S P Q C A Q E S D S V R A I C L P E
 1021 AAGCCAACCTGCAGCTGCCCCACTGGACAGAATGTGAGCTGTCTGGCTACGGCAAGCATA 1080
 A N L Q L P D W T E C E L S G Y G K H K
 30 1081 AGTCGTCTTCTCCTTTCTATTCTGAGCAGCTGAAGGAAGGGCATGTGAGGCTGTACCCCT 1140
 S S S P F Y S E Q L K E G H V R L Y P S
 1141 CCAGCCGCTGCACATCGAAGTTTCTGTTTAAACAAAACCGTCACAAACAACATGCTGTGTG 1200
 S R C T S K F L F N K T V T N N M L C A
 1201 CTGGAGACACGCGGAGCGGAGAGATCTATCCAAATGTGCACGATGCCTGCCAGGGTGAAGT 1260
 G D T R S G E I Y P N V H D A C Q G D S

1261 CAGGAGGCCCCCTTGGTGTGTATGAATGACAACCACATGACTTTGCTTGGCATCATCAGTT 1320
G G P L V C M N D N H M T L L G I I S W
5 1321 GGGGTGTTGGCTGTGGGGAGAAAGACATTCCAGGTGTATACACCAAGGTTACTAATTACC 1380
G V G C G E K D I P G V Y T K V T N Y L
1381 TAGGCTGGATTTCGAGACAACATGCGCCCATAACCAAGAACACGCAACTCCCTGGCAGCCC 1440
G W I R D N M R P
1441 CTGCCTTCCTCCACCCCAGAAGAAACACAAGGCAGAATGCTTCCTGACACCAGTTTCTCC 1500
1501 ACAAGCCTGCACACAGTACTAGTGGGGGGAGAACGTATAGGAGAGGGGAAAGGGTGTACT 1560
1561 TCCACAGGTACTTCCCACCTTCATAAGTTTTCAGGGGATAAGGTCTGATTTAGAATCCATT 1620
10 1621 TCTGTCAGACAAGAAGACAGATAAATGCCAACCCCTCCCAGAACACCACCATCTAGGGCA 1680
1681 GACAAGAGGTAGAATAAAAGCCCAACCTCCTAATCTGTCAACGTGAGCAGCTTTGGAAAT 1740
1741 GGGACCACCAAGATGAAAGTATCTTTCTAGTAAAAAATAGCTAGATCCTTCAGTAAAGAA 1800
1801 GTATCACATTAGAAATAAAATGTCCATGTATAGTCACAAGGACACCCAACAGCGACCTGG 1860
1861 GCCTCCTAACAAGGAATGGGCTGTCTGGCCAGATTGCGTTCCTCAGGCCATCCTTTAAGT 1920
15 1921 ATTTGACTACCCCTTTCTACAGCTTTTGGGAAGGAATTCCTTTTGTGTACAGTATAAATC 1980
1981 TTTTTCCTTTATAAACTTTATAGTAGAAGAACTGTATCATTCTGATAACTGCTAAACTAG 2040
2041 GCTTTAGCATTTTGTATATCAATCCATTGTAGTTGCCACAACCTCTGTATTATACTACACTG 2100
2101 GAAAAATAAATTCAGGCATATTTTTCACCTTAAAAAAA 2137

20

FIG. 26c

25

30

35

1 GCTACAGAGAAGCCCCGCCACTGTGGGCCACTGACCCACCCCCTGCTTTGAAATACAGG 60
61 GGAGGCCGAGGCTGTGCGGAGAGATTGGCGCTGAAGCCCTGCAAGAGCTGAGCTGACGGG 120
5 121 AAATCCTCTCCAGGAGAGAAGGAAGGCAAGGAGTGGCGAGTTTAAGGGACACCGCAGAAA 180
M
181 TGGTGAATACAATGAAGACAAAGCTGTTGTGTGTACTGCTGCTTTGTGGAGCAGTCTTCT 240
V N T M K T K L L C V L L L C G A V F S
241 CGTTGCCCAGGCAGGAAACCTACAGGCAATTGGCAAGGGGATCCAGAGCATATGGTGATC 300
L P R Q E T Y R Q L A R G S R A Y G D P
301 CCCATGCCACCTGCTACAAGGACCAGGGTGTACCTACAGGGGCACATGGAGCAGATCGG 360
H A T C Y K D Q G V T Y R G T W S T S E
10 361 AAAGTGGGGCTCAGTGTATCAACTGGAACAGCAATCTTCTGATCCGGAGGACCTACAATG 420
S G A Q C I N W N S N L L I R R T Y N G
421 GGCGGATGCCAGAGGCCGTCAAGCTGGGCCTTGGGAATCACAATTACTGTAGAAACCCAG 480
R M P E A V K L G L G N H N Y C R N P D
481 ATGGAGCCTCAAAACCTTGGTGTATGTATCAAGGCAAGGAAGTTCACCTCAGAGTCTT 540
G A S K P W C Y V I K A R K F T S E S C
15 541 GTAGCGTGCCTGTCTGCTCCAAGGCCACCTGTGGCCTGAGAAAGTACAAGGAGCCACAGC 600
S V P V C S K A T C G L R K Y K E P Q L
601 TTCACAGTACAGGAGGACTCTTCACAGACATCACCTCTCATCCATGGCAGGCTGCCATCT 660
H S T G G L F T D I T S H P W Q A A I F
661 TTGCCCAGAACAGAAGGTCATCAGGAGAAAGGTTCTTGTGTGGGGGAATATTGATCAGTT 720
A Q N R R S S G E R F L C G G I L I S S
20 721 CCTGCTGGGTCTGACTGCTGCCCCACTGCTTCCAGGAGAGGTATCCTCCCCAGCATCTTA 780
C W V L T A A H C F Q E R Y P P Q H L R
781 GGGTGGTTTTTGGGCAGAACATACCGGGTGAACCTGGAAAGGAAGAGCAGACATTTGAAG 840
V V L G R T Y R V K P G K E E Q T F E V
841 TCGAAAAATGCATCGTCCATGAGGAATTTGATGACGACACTTACAACAATGACATTGCAC 900
E K C I V H E E F D D D T Y N N D I A L
25 901 TGCTGCAGCTGAAATCGGGCTCGCCACAGTGTGCCCAAGAGAGTGACAGTGTCCGCGCCA 960
L Q L K S G S P Q C A Q E S D S V R A I
961 TCTGTCTCCCGGAAGCCAACCTGCAGCTGCCCCGACTGGACAGAATGTGAGCTGTCTGGCT 1020
C L P E A N L Q L P D W T E C E L S G Y
1021 ACGGCAAGCATAAGTCGTCTTCTCCTTTCTATTCTGAGCAGCTGAAGGAAGGGCATGTCA 1080
G K H K S S S P F Y S E Q L K E G H V R
1081 GGCTGTACCCCTCCAGCCGCTGCACATCGAAGTTTCTGTTTAAACAAAACCGTCACAAACA 1140
L Y P S S R C T S K F L F N K T V T N N
30 1141 ACATGCTGTGTGTGTGAGACACGCGGAGCGGAGAGATCTATCCAAATGTGCACGATGCCT 1200
M L C A G D T R S G E I Y P N V H D A C
1201 GCCAGGGTGACTCAGGAGGCCCCCTTGGTGTGTATGAATGACAACCACATGACTTTGCTTG 1260
Q G D S G G P L V C M N D N H M T L L G

	1261	GCATCATCAGTTGGGGTGTGGCTGTGGGGAGAAAGACATTCCAGGTGTATACACCAAGG	1320
		I I S W G V G C G E K D I P G V Y T K V	
	1321	TTACTAATTACCTAGGCTGGATTTCGAGACAACATGCGCCCATACCAAGAACACGCAACT	1380
		T N Y L G W I R D N M R P	
5	1381	CCCTGGCAGCCCCTGCCTTCCTCCACCCCAGAAGAAACACAAGGCAGAATGCTTCCTGAC	1440
	1441	ACCAGTTTCTCCACAAGCCTGCACACAGTACTAGTGGGGGGAGAACGTATAGGAGAGGGG	1500
	1501	AAAGGGTGTACTTCCACAGGTACTTCCCACCTTCATAAGTTTTTCAGGGGATAAGGTCTGAT	1560
	1561	TTAGAATCCATTTCTGTCAGACAAGAAGACAGATAAATGCCAACCCCTCCCAGAACACCA	1620
10	1621	CCATCTAGGGCAGACAAGAGGTAGAATAAAAAGCCCCAACCTCCTAATCTGTCAACGTGAGC	1680
	1681	AGCTTTGGAAATGGGACCACCAAGATGAAAGTATCTTTCTAGTAAAAAATAGCTAGATCC	1740
	1741	TTCAGTAAAGAAGTATCACATTAGAAATAAAATGTCCATGTATAGTCACAAGGACACCCA	1800
	1801	ACAGCGACCTGGGCCTCCTAACAAAGGAATGGGCTGTCTGGCCAGATTGCGTTCCTCAGGC	1860
	1861	CATCCTTTAAGTATTTGACTACCCCTTTCTACAGCTTTTGGAAGGAATTCCTTTTGTGT	1920
15	1921	ACAGTATAAATCTTTTTCTTTATAAACTTTATAGTAGAAGAACTGTATCATTCTGATAA	1980
	1981	CTGCTAAACTAGGCTTTAGCATTTTGATATCAATCCATTGTAGTTGCCACAACCTCTGTAT	2040
	2041	TATACTACACTGGAAAAATAAATTCAGGCATATTTTTCACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2100

FIG. 26d

20

25

30

35

1 GGCCTGAAGCCCTGCAAGAGCTGAGCTGACGGGAAATCCTCTCCAGGAG 50
 1ACAGGGCTGGAGAGAAAACCTCTGC..GAG 28
 51 AGAAGGAAGGCAAGGAGTGGCGAGTTTAAGGGACAC..CGCAGAAATGGT 98
 29 GAAAGGGAAGGAGCAAGCCGTGAATTTAAGGGACGCTGTGAAGCAATCAT 78
 99 GAATACAATGAAGACAAAGCTGTTGTGTGTACTGCTGCTTTGTGGAGCAG 148
 79 GGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAG 128
 149 TCTTCTCGTTGCCCAGGCAGGAAACCTACAGGCAATTGGCAAGGGGATCC 198
 129 TCTTCTGTTTCGCCCAGCCAGGAAATCCATGCCCGATTGAGAAGAGGAGCC 178
 199 AGAGCATATGGTGTGGCCTGCAAAGACGAAATAACCCAGATGACATACCG 248
 179 AGATCTTACCAAGTGATCTGCAGAGATGAAAAACGCAGATGATATACCA 228
 249 GCGACAAGAGTCGTGGCTGCGCCCCGAGGTCAGAAGCAAGCGGGTGGAAAC 298
 229 GCAACATCAGTCATGGCTGCGCCCTGTGCTCAGAAGCAACCGGGTGGAAAT 278
 299 ACTGCCAGTGCGATAGAGGCCAGGCCCGGTGCCACACCGTGCCCGTCAAC 348
 279 ATTGCTGGTGCAACAGTGGCAGGGCACAGTGCCACTCAGTGCCTGTCAAA 328
 349 AGTTGCAGTGAACCAAGGTGCTTCAATGGGGGACATGCTGGCAGGCTGT 398
 329 AGTTGCAGCGAGCCAAGGTGTTTCAACGGGGGCACCTGCCAGCAGGCCCT 378
 399 ATATTTCTCAGACTTTGTCTGTCTAGTGCCCTGCAGGATATACGGGGAAAC 448
 379 GTACTTCTCAGATTTTCGTGTGCCAGTGCCCCGAAGGATTTGCTGGGAAGT 428
 449 GGTGTGAAGTAGATACCCGTGCCACCTGCTATGAGGGCCAGGGTGTACC 498
 429 GCTGTGAAATAGATACCAGGGCCACGTGCTACGAGGACCAGGGCATCAGC 478
 499 TACAGGGGCACATGGAGCACAGCAGAAAGTAGGGTTGAGTGTATCAACTG 548
 479 TACAGGGGCACGTGGAGCACAGCGGAGAGTGGCGCCGAGTGACCAACTG 528
 549 GAACAGCAGCCTTCTGACCCGGAGGACCTACAATGGGCGGATGCCAGATG 598
 529 GAACAGCAGCGCGTTGGCCCAGAAGCCCTACAGCGGGCGGAGGCCAGACG 578
 599 CCTTCAACCTGGGCCTTGGGAATCACAATTACTGCAGAAACCCAAATGGA 648
 579 CCATCAGGCTGGGCCTGGGGAACCACAATACTGCAGAAACCCAGATCGA 628
 649 GCCCCAAAACCTTGGTGCTATGTCATCAAGGCAGGGAAGTTCACCTCGGA 698
 629 GACTCAAAGCCCTGGTGCTACGTCTTTAAGGCGGGGAAGTACAGCTCAGA 678
 699 GTCCTGTAGCGTGCCTGTCTGCTCCAAGGCCACCTGTG..... 736
 679 GTTCTGCAGCACCCCTGCCTGCTCTGAGGGAAACAGTG..... 716

5

15

20

25

30

35

1237 CATGTCAGGCTGTACCCCTCCAGCCGCTGCGCACCCAAGTTTCTGTTTAA 1286
1475 CATGTCAGACTGTACCCATCCAGCCGCTGCACATCACAACATTTACTTAA 1524
5 1287 CAAAACCGTCACAAACAACATGCTGTGTGCTGGAGACACGCGGAGCGGAG 1336
1525 CAGAACAGTCCACCACAACATGCTGTGTGCTGGAGACACTCGGAGCGGCG 1574
1337 AGATCTATCCAAATGTGCACGATGCCTGCCAGGGTGACTCAGGAGGCCCC 1386
1575 GGCCCCAGGCAAACTTGCACGACGCCTGCCAGGGCGATTCTGGGAGGCCCC 1624
1387 TTGGTGTGTATGAATGACAACCACATGACTTTGCTTGGCATCATCAGTTG 1436
1625 CTGGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTGGTGGGCATCATCAGCTG 1674
10 1437 GGGTGTGTGGCTGTGGGGAGAAAGACGTTCCAGGTGTATACACCAAGGTTA 1486
1675 GGGCTTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCGGGTGTGTACACCAAGGTTA 1724
1487 CTAATTACCTAGGCTGGATTTCGAGACAACATGCACCTGTAACCAAGAACA 1536
1725 CCAACTACCTAGACTGGATTTCGTGACAACATGCGACCGTGACCAGGAACA 1774
1537 CACAACCTCCCTGGCAGC.....CCCTGCCTTCCTCCAGCCCAGAAG 1577
15 1775 CCGGACTCCTCAAAGCAAATGAGATCCCGCCTCTTCTTCTTCCAGAAGAC 1824
1578 AAACACAAGGCAGAATGCTTCTGACACCAGTTTCTCCACAAGCCTGCAC 1627
1825 ACTGCAAAGGCGCAGTGCTTCTCTACAGACTTCTCCAGAC...CCACCAC 1871
1628 ACAGTACTAGTGGGGGAGAACGTATAGGAGAGGGGAGAGGGTATACTTC 1677
1872 ACCGCAGAAGCGGGACGAGACCTACAGGAGAGGGAAGAGTGCAT...TTT 1919
20 1678 CACAGGTACTTCCCACTTCATAAGTTTTTCAGGGGATAAGGTCTGATTTAG 1727
1920 CCCAGATACTTCCCATTTTGGAAAGTTTTCA..GGACTTGGTCTGATTTCA 1967
1728 AATCCATTTCTGTGACACAAGAAGACAGATAAATGCCAACCCCTCCAGA 1777
1968 GGATACTCTGTGATGGGAAGACATGAATGCACACTAGCCTCTCCAGGA 2017
1778 ACACCACCATCTAGGGCAG.....ACAAGAGGTAGAATAAAA 1814
25 2018 ATGCCTCCTCCCTGGGCAGAAGTGGCCATGCCACCCTGTTTTCAGCTAAA 2067
1815 GCCCAACCTCCTAATCTGTCAACATGAGCAGCTTTGGAAATGGGACCACC 1864
2068 GCCCAACCTCCTGACCTGTACCGTGAGCAGCTTTGGAAACAGGACCACA 2117
1865 AAGATGAAAGTATCTTTC..TAGTAAAAAATAGCTAGATCCTTCAGTAAA 1912
2118 AAAATGAAAGCATGTCTCAATAGTAAAAGATAACAAGATCTTTCAGGAAA 2167
30 1913 GAAGTATCACATTAGAAATAAAATGTCCATGTATAGTCACAAGGACGCCC 1962
2168 GACGGATTGCATTAGAAATAGACAGTATATTTATAGTCACAAGAGCCAG 2217
1963 AACAGCGACCTGGGCCTCCTAACAAGGAATGGGCTGTCTGGCCAGATTGC 2012
2218 CAGGGC.....TCAAAGTTGGGGCAGGCTGGCTGGCCCGTCATG 2256

```

2013 GTTCCTCAGGCCATCCTTTAAGT.....ATTTGACTATCCTCTTTCT 2054
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
2257 TTCTTCAAAAGCACCTTGACGTCAAGTCTCCTTCCCCTTTCCCCACTCC 2306
5    2055 ACAGCTCTTGAAGGAATTCCTTTTGTGTAC.....AGTATAAATC 2095
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
2307 CTGGCTCTCAGAAGGTATTCCTTTTGTGTACAGTGTGTAAAGTGTAATC 2356

2096 TTTTTCCTTTATAAACTTTATAGTAGAAGAACTGTATCATTTCTGATAACT 2145
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
2357 CTTTTTCTTTATAAACTTTAGAGTAGCATGA...GAGAATTGTATCATTT 2403

10   2146 GCTAAACTAGGCTTTAGCATTTTGATATCAATCCATTGTA..... 2185
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
2404 GAACAACTAGGCTTCAGCATATTTATAGCAATCCATGTTAGTTTTTACTT 2453

2186 ...GTTGCCACGACTCTGTATTATACTACACTGGAAAAATAAATTCAGGC 2232
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
2454 TCTGTTGCCACAACCCTGTTTTATACTGTACT....TAATAAATTCAGAT 2499

15   2233 ATATTTTTTCACTTAAAAAAA 2252
      | | | | | | | | | |
2500 ATATTTTTTCACAGTTTTTCC 2519

```

FIG. 27. Sammenligning mellom v-PA-alfa-1-cDNA-sekvensen (øvre linje i oppstillingen) og sekvensen til t-PA (nedre linje)

FIG. 26a: Fullstendig DNA-sekvens til cDNA-innskuddet i den lengste plasmidklon fra gruppe alfa-1 og utledet aminosyre-sekvens. Den kodende sekvens begynner med nukleotid 94 (ATG....) og slutter med stoppkodonet ved nukleotid 1527 (...TAA). Den utledede aminosyresekvens er gitt i énbokstavkode, hver aminosyre står under det første nukleotid i tripletten den kodes av.

FIG. 26b: Fullstendig DNA-sekvens til cDNA-innskuddet i plasmidklonen av type alfa-2 med utledet aminosyresekvens. Den kodende sekvens begynner med nukleotid 85 (ATG...) og slutter med stoppkodonet ved nukleotid 1518 (...TAA). Den utledede aminosyresekvens er gitt i énbokstavkode, hver aminosyre står under det første nukleotid i tripletten den kodes av.

FIG. 26c: Fullstendig DNA-sekvens til cDNA-innskuddet i den lengste plasmidklon av gruppen beta med utledet aminosyre-

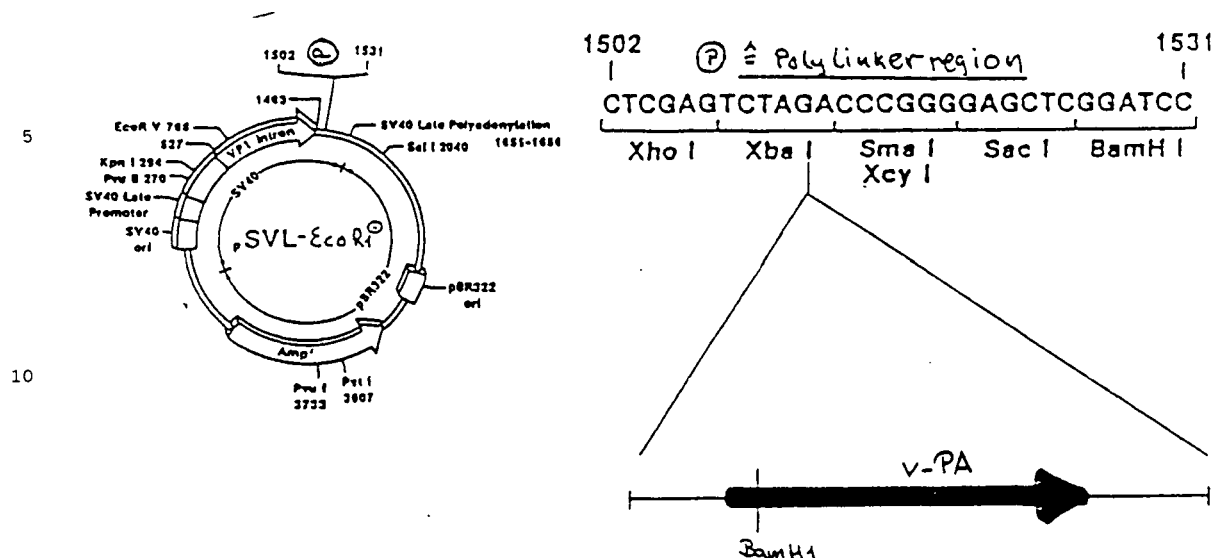
sekvens. Den kodende sekvens begynner med nukleotid 117 (ATG...) og slutter med stoppkodonet ved nukleotid 1412 (...TAA). Den utledede aminosyresekvens er gitt i énbokstavkode, hver aminosyre står under det første nukleotid i tripletten den kodes av.

FIG. 26d: Fullstendig DNA-sekvens til cDNA-innskuddet i plasmidklonen av type gamma med utledet aminosyresekvens. Den kodende sekvens begynner med nukleotid 180 (ATG...) og slutter med stoppkodonet ved nukleotid 1364 (...TAA). Den utledede aminosyresekvens er gitt i énbokstavkode, hver aminosyre står under det første nukleotid i tripletten den kodes av.

Eksempel 19

Oppbygging av ekspresjonsvektorer med de kodende sekvenser for det aktive stoff v-PA og testing av disse ved mikroinjeksjon i oocytter

De kodende sekvenser fra cDNA-klonene av v-PA-formene α_1 , α_2 , β og γ skaffes til veie ved spalting med restriksjonsendonukleasen EcoRI. Etter behandling med Klenow-fragmentet av *E. coli* DNA-polymerase I og isolering fra lavtemperatursmelte agarosegeler skytes de inn i XbaI-setet i vektoren pSVL-EcoRI, som har blitt fylt opp med Klenow-fragmentet fra *E. coli* DNA-polymerase I og behandlet med fosfatase fra kalvetarm (Boehringer-Mannheim). Korrekt orientering testes med BamHI. pSVL-EcoRI er et derivat av det kommersielt tilgjengelige SV40 ekspresjonsplasmid pSVL (Pharmacia).



Skjematisk gjengivelse av ekspresjonsvektoren pSVL-EcoRI med angivelse av v-PA-kloningssettet

Disse ekspresjonsvektorene renses over en cesium-kloridgradient og benyttes til mikroinjeksjon i *Xenopus laevis*-oocytter.

Oocyttingeksjon ble utført i henhold til følgende artikler:

1. Gurdon, J.B. og Wakefield, L. i "Microinjection and Organelle Transplantation Techniques", red. Celis, J.E., Graessmann, A. og Loyter, A., Academic Press, London, 1986.

2. Colman, A. i "Transcription and Translation - A Practical Approach", red. Hames, R.J. og Higgins, S.J., IRL-Press, Oxford, 1984.

3. Langer, G. "Analyse des Drosophila U1 SURNA Promotors in homologen *in vitro* und heterologen *in vitro* Transkriptionssystemen", Ph.D. Thesis, University of Kaiserslautern, 1987.

Etter innstøping i en fibrinplate fremstilt med Barth-medium (artikkel 2) gav oocytter injisert med v-PA-ekspresjonsvektorene lyseringer. Ved benyttelse av en kaseinplate i stedet for fibrinplaten fant ingen lyse sted (α_1 , α_2 ,

β). Oocytter injisert med en vektor uten v-PA-sekvens gav ingen lysering.

v-PA-cDNA-sekvensene inneholder en funksjonell signalpeptidsekvens ansvarlig for eksport av v-PA-protein ut
5 av cellen.

Disse resultater viser klart at v-PA-cDNA-klonene er fullstendige og at de, etter å ha blitt satt inn i en passende ekspresjonsvektor, produserer aktivt stoff med absolutt fibrinspesifisitet.

10

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et i det vesentlige
5 rent protein som er trombolytisk, aktiverer plasminogen i
nærvær av fibrin, men i det vesentlige ikke i nærvær av
fibrinogen, og er allosterisk, hvor proteinet er et v-PA α_1
med aminosyresekvensen ifølge figur 26a, omfattende uttrykking
av DNA som koder for v-PA α_1 , i mikroorganismen ifølge krav 3,
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at v-PA α_1 kromatograferes
på en kolonne, det aktive v-PA elueres kvantitativt etter
vasking av kolonnen, de oppsamlede fraksjoner gelfiltreres i
fravær av salter, og gelfiltreres deretter nok en gang i
nærvær av en fysiologisk saltoppløsning.
- 15 2. Isolert DNA,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det koder for et
protein fremstilt ifølge krav 1 og har nukleotidsekvensen
ifølge figur 26a.
- 20 3. Mikroorganisme,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert med
en vektor som omfatter DNA ifølge krav 2, og er i stand til å
uttrykke det gitte genet.
- 25 4. Fremgangsmåte for fremstilling av et i det vesentlige
rent protein ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det har den N-terminale
aminosyresekvens Ala · Tyr · Gly · Val · Ala ...
- 30 5. Fremgangsmåte for fremstilling av et i det vesentlige
rent protein ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det har den N-terminale
aminosyresekvens Ala · Tyr · Gly · Val · Ala · Cys · Lys · Asp ·
35 Glu · Ile · Thr · Gln · Met · Thr · Tyr · Arg · ...

6. Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat,

k a r a k t e r i s e r t v e d at en forbindelse fremstilt ifølge hvilket som helst av kravene 1, 4 og 5, blandes

5 med vanlige hjelpestoffer og eksipienser, slik som for eksempel gummi arabicum, talkum, stivelse, mannitol, metylcellulose, laktose, slike overflateaktive midler som Tween eller Myrj, magnesiumstearat, vandige eller ikke-vandige bærere, parafinderivater, fukte-, dispergerings-, emulgerings-
10 og konserveringsmidler, og smaksstoffer for å regulere smaken, for eksempel eteriske oljer.