

(19)



(10) **LT 96-158 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **96-158** (51) Int. Cl. (2006): **A61K 38/16**
A61K 38/55
C07K 14/00
C07K 14/81
C12N 1/15
C12N 1/21
C12N 5/10
C12N 15/12
C12N 15/63
- (22) Paraiškos padavimo data: **1996 11 15**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1997 06 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US95/04488**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1995 04 11**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **1996 11 15**
- (30) Prioritetas: **229286, 1994 04 18, US**
276936, 1994 07 19, US
- (71) Pareiškėjas:
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA, Center for Technology Transfer, Suite 300, 3700 Market Street, Philadelphia, PA 19104-3147, US
- (72) Išradėjas:
Harvey RUBIN, US
Barry COOPERMAN, US
Norman SCHECHTER, US
Michael PLOTNICK, US
Zhi Mey WANG, US
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Liudmila GERASIMOVICH, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis“, Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Rekombinantinių serino proteazės inhibitorių gamybos būdas ir panaudojimas
- (57) Referatas:
Sukurtas rekombinantinio serino proteazės inhibitorių, galinčių efektyviai moduluoti serino proteazės aktyvumą, gamybos būdas. Pateikiamos kompozicijos, galinčios moduluoti serino proteazės aktyvumą ir šių kompozicijų panaudojimas, reguliuojant uždegiminius procesus ląstelėse.

REKOMBINANTINIŲ SERINO PROTEAZĖS INHIBITORIŲ GAMYBOS BŪDAS IR PANAUDOJIMAS

Išradimo pagrindas

5 Serino proteazės inhibitoriai, arba "serpinai", yra inhibitorių grupė, kuriai priklausančys fermentai dalyvauja daugelyje gyvybiškai svarbių biologinių procesų. Serpinų grupės nariai vaidina svarbų vaidmenį daugelyje biologinių procesų, įskaitant (tačiau ne tik) uždegiminius procesus, apvaisinimą, navikinių
10 ląstelių migraciją, neurotropizmą bei karščio šoką. Maspinas neseniai buvo atrastas ir apibūdintas kaip apsauginis serpinas, normaliomis sąlygomis esantis krūties epitelio ląstelėse, bet neaptiktas daugelyje krūties karcinomos ląstelių linijų. Serpinai randami augaluose, prokarijotuose, vabzdžiuose ir aukštesniuose
15 gyvūnuose. Gamtinės serpinų mutacijos ir modifikacijos yra daugelio rimtų ligų priežastis. Serpinų funkcijos sutrikimas siejasi su plaučių, kepenų ir kraujo krešėjimo sutrikimais, tokiais kaip emfizema, kepenų cirozė, trombozė ir plaučių embolija.

Serpinų sąveika su endogeninėmis bei mikrobų proteazėmis
20 sukuria visą spektrą įvairių molekulių rūšių, kurių kiekviena yra labai evoliuciškai pastovaus homeostatinio mechanizmo sudėtinė dalis. Šis mechanizmas padeda išlaikyti organizmo išgyvenimui būtinas serpinų koncentracijas. Pavyzdžiui, serpino-proteazės kompleksas ir hidrolizuota, neaktyvi intaktinio serpino forma
25 skatina interleukino-6 gamybą, kuris duoda signalą hepatocitams padidinti baltymų, būdingų ūmiai fazei, gamybą, tarp jų serpinų šeimos baltymų subpopuliacijos gamybą. Jei serpinų-baltymų kompleksai yra greitai pašalinami iš apykaitos, tai suskaidytos bei intaktinės šių kompleksų formos gali kauptis uždegimo vietose.
30 Šios sankaupos sukuria kompleksinę mikroaplinką, kurioje esama

kaip chemoatraktantų, taip ir chemotaksės inhibitorių, o taip pat neutrofilų degranuliacijos aktyvatorių bei inhibitorių, leukotrienų, trombocitus aktyvuojančio faktoriaus (TAF) ir padidinta superoksidų gamyba. Ekstremalus kelių virusų, sukeliančių išbėrimus, virulentiškumas iš dalies priskiriamas serpinui, kurio taikiny yra cisteino proteinazė (ICE), interleukiną 1- β konvertuojantis fermentas.

Įvairūs gyvūnų modeliai parodė, kad nekontroliuojamas serino proteazės aktyvumas yra vienas iš svarbiausių veiksnių, apsprendžiančių plaučių pažeidimų mechanizmus ir šis atitinkamas serpino atsakas kontroliuoja pažeidimo laipsnį. Pavyzdžiui, antitrombino III (ATIII) derinys su α -1-proteazės inhibitoriumi (α 1P1) saugojo avis nuo endotoksinų sukeltų plaučių pažeidimų, kur atskiri serpinai nebuvo tokie efektyvūs, kaip šis derinys (Redens et al., Circ. Shock 1988, 26, 15). Redens ir kt. taip pat parodė, kad ATIII apsaugo nuo išsėtinės intravaskuliarinės koaguliacijos išplitimo endotokseminėse pelėse (Emerson et al., Circ. Shock 1987, 21, 1). H_2O_2 ir elastazės chlormetil-ketono inhibitorius blokuoja reaktyvų deguonies poveikį neutrofilų elastazės sukeltos plaučių edemos atveju žiurkėse ir α 1P1 sumažina bleomicinu sukeltą plaučių uždegimą bei tolesnę fibrozę. (Baird et al., Physiol. 1986, 61, 2224 and Nagai et al., Am.Rev.Resp.Dis. 1992, 145, 651). Tačiau kitoje sistemoje neutrofilų elastazės inhibitoriai, eglinas C ir mažo molekulinio svorio junginys L 658, 758 nepajėgė inhibuoti leukotrienu B4 sukulto bei neutrofilų tarpininkaujamo sulipimo, diapedezės ar kraujo indų pralaidumo padidėjimo (Rosengeren et al., Am J Physiol. 1990, 259, H1288). Kaip rodo šie tyrimai, proteolitinių fermentų inhibitoriai, taikomi terapijoje, gali apriboti molekulinis ir ląstelinis uždegimo mechanizmus bei sumažinti audinių pažeidimą.

Yra dvi serpinų šeimos pošeimės. Vienai iš pošemių priklauso baltymai, kuriems kol kas neapibūdinta jokių atpažįstamų serino proteazių. Kaip šios pošeimės pavyzdį, galime pateikti ovalbuminą, angiotenzinogeną ir steroidinius surišančius globulinius. Antrajai šeimai priklauso nariai, kurių inhibicinis taikinyis yra bent viena serino proteazė. Ši serpinų pošeimė, kuri inhibuoja serpinų proteazes, pasižymi būdingomis savybėmis, kurios nulemia inhibitoriaus aktyvumą, t.y. atpažįstamo fermento inhibavimo antros eilės greičio konstantos apima intervalą tarp 10^2 ir $10^7 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$; esant tam tikroms sąlygoms fermento-inhibitoriaus kompleksas yra stabilus ir gali būti nustatytas kaip darinys, kurio molekulinis svoris didesnis nei atskirų komponentų SDS poliakrilamido gelyje; ir po laikino ryšio suskaidymo reaktyviame centre atsiranda dideli konformaciniai pakitimai, kurie didina baltymo terminį atsparumą. Šios pošeimės serpino pavyzdys yra $\alpha 1$ -antichimotripsinas (ACT), kuris yra chimotripsino (Chtr) inhibitorius. ACT didžia dalimi sintetinamas kepenyse ir yra vienas iš ūmios fazės veiksnių, kurio koncentracija greitai padidėja daugiau nei 5 kartus įvykus įvairių tipų pažeidimams, tokiems kaip, chirurginė operacija, ūmus miokardo infarktas, nudegimai, autoimuninės ligos, piktybiniai augliai, infekcijos ir kepenų transplantato atmetimo reakcijos. ACT taip pat turi ryšį su nervų sistemos plastiškumu ir siejasi su beta amiloidų sankaupomis senstančiose smegenyse, sergant Alzheimer'io liga, Dauno sindromu ir paveldimų cerebralinių hemoragijų su amiloidoze olandišku variantu. Buvo parodyta, kad kaip natyvi, taip ir rekombinantinė ACT (rACT) inhibuoja žmogaus neutrofilų superoksidų gamybą suspensijoje.

Bendrai, inhibuojančio serpino reaktyvi kilpa yra sudaryta iš pakankamai trumpos amino rūgščių sekos. Serpinų selektyvumas,

inhibuojant specifinį proteazės tipą priklauso nuo reaktyvaus centro, esančio ant serpino paviršiaus, amino rūgščių sekos (Jiang H. et al., J.Biol.Chem. 1994, 269, 55-58), parodė, kad serpinų iš lepidoptera genties vabzdžių *Manduca sexta* selektyvumas gali būti pakeistas, keičiant amino rūgščių seką reaktyvioje kilpoje. Buvo parodyta, kad pre-iRNA splaisingas sukuria inhibicijos įvairovę ir galimybę reguliuoti daugelį proteinazių, naudojant tą patį baltymų tinklą, kuris prijungtas prie skirtingų reaktyvios srities kasečių.

Remiantis nedidelių (apie 50 amino rūgščių) inhibitorių ir taikinio-fermento suformuotų kompleksų trimate struktūra, manoma, kad P3-P3' sritis, 356-361 amino rūgštys ACT, (Schechter I. and Berger A.C. nomenklatūra, Biochemistry Biophysics Research Communication 1967, 27:157) serpinų kilpoje arba taip vadinamame "aktyvaus saito srityje" (arba "masalo" srityje) tarnauja kaip pirminio kontakto vieta arba surišimo su proteaze vieta. Buvo nustatyta, kad kita šios kilpos dalis (nuo P14 iki P9), vadinama "šarnyro sritis", taip pat yra svarbi inhibitoriniam serpinų aktyvumui. Neseniai buvo sukurtas serino proteazės aktyvumo moduliavimo ląstelėse ar audiniuose metodas, kuris remiasi tuo, kad parenkama proteazė-taikinys, kuri kaupiasi audiniuose ar ląstelėse, gaminamas rekombinantinis serino proteazės inhibitorius, turintį proteazę surišančią sritį bei "šarnyro" sritį reaktyvaus centro kilpoje, kurie modifikuoja amino rūgščių seką taip, kad sąveika tarp inhibitoriaus ir proteazės-taikinio pakeičiama ir, veikiant ląsteles arba audinius modifikuotu serino proteazės inhibitoriumi, serino proteazės aktyvumas yra moduluojamas. Taip pat pateikiamos kompozicijos, galinčios efektyviai moduluoti serino proteazės aktyvumą, kurių sudėtyje yra rekombinantinis serino proteazės inhibitorius, turintis reaktyvios kilpos proteazę surišančio saito ir šarnyro srities modifikuotas amino rūgščių sekas. Šios

kompozicijos yra naudingos reguliuojant uždegiminiuosius procesus. Be to, pateikiamas serino proteazės inhibitorių, galinčių efektyviai moduluoti serino proteazės aktyvumą, gamybos būdas, apimantis serino proteazės inhibitoriaus sekos nustatymą; minėtos serino proteazės inhibitoriaus reaktyvios kilpos bei šios reaktyvios kilpos, turinčios pirmą amino rūgščių seką iš proteazę surišančios srities ir antrą amino rūgščių seką iš šarnyro srities, identifikavimą; pirmosios amino rūgščių sekos iš proteazę surišančios srities modifikavimą tokiu būdu, kad yra pakeičiamas rekombinantinės serino proteazės inhibitoriaus selektyvumas kitoms proteazėms; antrosios amino rūgščių sekos šarnyro srityje modifikavimą tokiu būdu, kad rekombinantinės serino proteazės inhibitorius galėtų efektyviai moduluoti šios serino proteazės aktyvumą; ir šio modifikuoto serino proteazės inhibitoriaus sintezę.

15

Išradimo esmė

Šio išradimo tikslas yra rekombinantinio serino proteazės inhibitoriaus, galinčio efektyviai moduluoti serino proteazės aktyvumą, gamybos būdo sukūrimas. Šis būdas apima serino proteazės inhibitoriaus sekos nustatymą, minėtos serino proteazės inhibitoriaus reaktyvios kilpos bei šios reaktyvios kilpos, turinčios pirmą amino rūgščių seką iš proteazę surišančios srities ir antrą amino rūgščių seką iš šarnyro srities, identifikavimą; pirmosios amino rūgščių sekos iš proteazę surišančios srities modifikavimą tokiu būdu, kad yra pakeičiamas rekombinantinės serino proteazės inhibitoriaus selektyvumas kitoms proteazėms; antrosios amino rūgščių sekos šarnyro srityje modifikavimą tokiu būdu, kad rekombinantinės serino proteazės inhibitorius galėtų efektyviai moduluoti šios serino proteazės aktyvumą; ir šio modifikuoto serino proteazės inhibitoriaus sintezę.

30

Kitas šio išradimo aspektas yra kompozicijos, galinčios efektyviai moduluoti serino proteazės aktyvumą, kurių sudėtyje rekombinantinis serino proteazės inhibitorius, turintis reaktyvios kilpos proteazę surišančio saito ir šarnyro srities modifikuotas amino rūgščių sekas.

Dar kitas šio išradimo objektas yra serino proteazės aktyvumo moduliavimo ląstelėse ar audiniuose būdas, kuris remiasi tuo, kad parenkama proteazė-taikinys, kuri kaupiasi audiniuose ar ląstelėse; gaminamas rekombinantinis serino proteazės inhibitorius, turintis proteazę surišančią sritį bei "šarnyro" sritį reaktyvaus centro kilpoje, kurie modifikuoja amino rūgščių seką taip, kad sąveika tarp inhibitoriaus ir proteazės-taikinio pakeičiama ir, veikiant ląsteles arba audinius modifikuotu serino proteazės inhibitoriumi, serino proteazės aktyvumas yra moduluojamas.

Dar kitas šio išradimo aspektas yra žmogaus α -1-antichimotripsino analogai, kurie yra efektyvūs chimotripsino inhibitoriai.

Taip pat pateikiamos nukleino rūgščių sekos, koduojančios serino proteazės inhibitorius, tame tarpe ir α -1-antichimotripsino analogus, ekspresijos vektoriai, turintys šias nukleino rūgščių sekas, transformuotos šeimininko ląstelės, ekspresuojančios šias nukleino rūgščių sekas, ląstelių kultūros ekspresuojančios serino proteazės inhibitorius ir baltymų preparatai, kurių sudėtyje yra serino proteazės inhibitoriai.

25

Išradimo aprašymas

Serino proteazės inhibitoriai, priklausantys serpinų glikoproteinų šeimai, yra svarbūs organizmo homeostazės palaikyme. Serpinai reguliuoja proteazes, dalyvaujančias daugelyje svarbių biologinių procesų, tarp jų (tačiau tuo neapsiribojant)

30

kraujo krešėjime, apvaisinime bei uždegiminiuose procesuose. Manoma, kad įvairūs serpinai gyvūnuose ir vabzdžiuose evoliucionavo dėl genų duplikacijos ir persiskirstymo, dėl kurių atsirado didelis serpinų genų skaičius viename organizme, kiekvienas šių genų koduoja baltymą, pasižymintį unikalia reaktyvia sritimi bei fiziologine funkcija. Serpino pavyzdys yra antichimotripsinas (ACT), kuris inhibuoja chimotripsiną, pankreatinę elastazę, tukliųjų ląstelių chimazę ir katepsiną G. Padidėjusi ACT koncentracija stebima, esant daugeliui organizmo pažeidimų, tarp jų: chirurginių operacijų metu, esant ūmiam miokardo infarktui, nudegimams, autoimuninėms ligoms, piktybiniais augliams, infekcijoms ir kepenų transplantato atmetimo reakcijoms.

ACT siejasi su tam tikrais ląstelių ir citokinų sąlygojamais reiškiniais. Pavyzdžiui, auglių nekrozės faktorius skatina trombocitų aktyvaciją per nuo TNF priklausančio katepsino G atpalaidavimą iš neutrofilų. Šis efektas gali būti blokuojamas ATC. Be to, leukotrieno B₄ sintezė ir atpalaidavimas, ir trombocitus aktyvuojantis faktorius iš TNF'u stimuliuotų neutrofilų, gali būti blokuojamas ATC. Neutrofilų katepsinas G ir tukliųjų ląstelių chimazė yra svarbiausi prieš uždegiminio atsako odoje ir plaučiuose komponentai. Todėl galima pasiūlyti teoriją, kad ACT vaidina svarbų vaidmenį mažinant uždegimą ir tai yra antrinė iš granulinių atsipalaidavusių fermentų veiklos išdava. Taip pat buvo parodyta, kad natyvus ir rekombinantinis ACT inhibuoja ir žmogaus neutrofilų sukeltą superoksidų atsiradimą. Buvo nustatyta, kad intaktinių ląstelių sistemoje ir intaktinis ACT, ir ACT komplekse su chimotripsinu yra vienodai veiksmingi inhibuojant laisvų radikalų gamybą žmogaus neutrofiluose, kurie buvo stimulioti vienu iš šių preparatų: f-Met-Leu-Phe, Con A ar

PMA. Buvo pastebėta, kad šeimose, kuriose konstatuojama tik 50% normalios ACT cirkuliacijos, yra plaučių funkcijos sutrikimų su dideliais liekamaisiais tūriais bei padažnėjusios atopinės ligos. Todėl pasirodo, kad intaktinis ACT, taip pat kaip ir suskaldytas ar
5 komplekse su kita medžiaga, vaidina svarbiausią vaidmenį reguliuojant uždegimą bei tam tikrus vystymosi veiksnius.

ACT turi daug bendrų savybių su kitais serpinų šeimos nariais. Svarbiausia ACT ir kitų serpinų savybė, kuri palaiko inhibicinį aktyvumą bei specifiškumą, yra judrios reaktyvios kilpos
10 buvimas.

Manoma, kad serino proteazės inhibitoriai, arba serpinai, inhibuoja atitinkamas serino proteazes-taikinius pagal toliau pateikiamą bendrą mechanizmą. Serino proteazei serpinas reikalingas, kaip substratas proteolitinės atakos pradžiai. Serpinai
15 formuoja glaudžius (1:1) kompleksus su jų taikiniaisi-proteazėmis dėka sąveikos specifiniame saite (P1 liekana). Standartinis žymėjimas apibrėžia P1 poziciją, kaip N-galinę poziciją skaidymo vietoje. P2 yra N galinė pozicija P1, ir taip toliau. P1 pozicija yra eksponuojamoje serpino srityje ir vadinama reaktyvia kilpa.
20 Surinkta daug struktūrinių duomenų apie peptidų inhibitorius, parodančių, kad reaktyvi inhibitoriaus kilpa yra antiparalelioje β -grandies konformacijoje, kuri dar vadinama kanonine. Tačiau nesenai buvo nustatyta, kad reaktyvi intaktinio serpino kilpa pasižymi tam tikru būdu iškreipta spiralės konformacine struktūra
25 su iš serpino išorės išsikišusiomis P1 šoninėmis grandimis. Reaktyvi kilpa nėra pertvarkyta į kanoninę, antiparalelią beta grandies konformaciją, veikiau ten pasikeičia spiralės struktūra taip, kad galėtų efektyviai susirišti su proteaze. Susirišimas su proteaze sukelia konformacinius pakitimus serpine, kuris, esant tam tikroms
30 sąlygoms, gali pats pakeisti proteazės struktūrą. Proteazės

konformacijos pakitimas efektyviai pašalina jos fermentinį aktyvumą ir todėl fermentinė reakcija, kurioje dalyvauja ši proteazė, yra sustabdoma.

Svarbus serpinų tyrimo aspektas yra ryšis tarp serpinų ir jų fermentų-taikinių disbalanso ir audinių destruktijos bei degeneratyvių ligų. Dėka nuodugnaus biocheminių bei struktūrinių šios serpinų bei genų inžinerijos būdu gautų serpinų variantų sąveikos su proteazėmis-taikiniais savybių tyrimo buvo gauti nauji baltymai, pasižymintys terapinėmis savybėmis. Pagal trimatį kompleksų, kuriuos suformuoja nedideli (apie 50 amino rūgščių) peptidiniai inhibitoriai su savo taikiniais-fermentais, modelį manoma, kad P3-P3' sritis serpinų kilpoje arba kitaip vadinamoje "aktyvaus saito srityje" (arba šarnyro srityje) tarnauja kaip pirminio kontakto vieta arba susirišimo su fermentu vieta. Serpino inhibicinis aktyvumas tam tikro fermento atžvilgiu gali būti pakeistas, modifikuojant amino rūgštis šioje proteazę surišančioje srityje dėka mutacijos ar delecijos. Pavyzdžiui, buvo nustatyta, kad "laukinio" tipo ACT P1' pozicijoje leuciną pakeitus metioninu gaunamas mutantas, galintis iš dalies inhibuoti žmogaus neutrofilų elastazę, palaikant jos sugebėjimą inhibuoti chimotripsiną, katepsiną G ir chimazę (Žr. Lentelės 1 ir 2). Taip pat buvo nustatyta, kad variantas, kuriame nėra P6'-P9' liekanų, priklausančių reaktyviai kilpai, išsaugo serino proteazės inhibicinį aktyvumą, nukreiptą prieš chimotripsiną, ir padidina aktyvumą prieš žmogaus neutrofilų elastazę. Žmogaus neutrofilų elastazės, chimotripsino, katepsino G bei chimazės aktyvumai buvo nustatyti pagal metodiką, aprašytą 2 - 5 šio išradimo pavyzdžiuose. Plazmino ir trombino aktyvumai taip pat buvo nustatyti, naudojant gerai žinomas metodikas, pavyzdžiui Cooperman et al., J.Biol.Chem. 1993, 268, 23616.

Be to buvo nustatyta, kad šarnyro sritis (P14-P9) yra svarbi kilpos dalis, palaikanti inhibitorinį serpinų aktyvumą. Amino rūgščių sekos palyginimas parodė, kad kiekvieno inhibitorinio serpino šarnyro sritis yra labai konservatyvi amino rūgštims su mažomis ir neutraliomis šoninėmis grandimis, tokiomis kaip alaninas ar treoninas, kitaip nei yra su krūvį turinčiomis liekanomis, tokiomis kaip argininas ar glutamino rūgštis. Treonino pakeitimas argininu rekombinantinio ACT (rACT) P14 pozicijoje sukelia substrato inhibitorinio aktyvumo praradimą (Žr. Lenteles 1 ir 2).

Šiame išradime pateikiamas rekombinantinio serino proteazės inhibitoriaus, sugebančio efektyviai moduluoti jų aktyvumą, gamybos būdas. Šiame būde nustatoma pasirinkto serino proteazės inhibitoriaus seka ir identifikuojama reaktyvi serino proteazės inhibitoriaus kilpa. Šios kilpos proteazę surišančio saito amino rūgščių seka modifikuojama taip, kad pakistų serino proteazės inhibitoriaus selektyvumas įvairių kitų proteazių atžvilgiu. Proteazę surišančio saito modifikacijos gali būti vienos ar kelių šios sekos amino rūgščių pakeitimas ar delecija. Optimaliausiame variante ši modifikacija apima kelių amino rūgščių proteazę surišančio saito srityje pakeitimą amino rūgštimis, kurios, kaip žinoma, yra kituose serino proteazės inhibitoriuose. Pavyzdžiui, leucino, esančio P1' ACT pozicijoje, pakeitimas metioninu (kuris yra amino rūgštis, esanti toje pat pozicijoje serpine $\alpha 1P1$ - žmogaus neutrofilų elsatazės inhibitoriuje) sukuria mutantą, sugebantį inhibuoti chemotripsiną, katepsiną-G, chimazę bei žmogaus neutrofilų elsatazę (Žr. lenteles 1 ir 2). Atitinkami pakeitimai proteazę surišančio saito amino rūgščių sekoje gali būti tikrinami vienu iš specialistų nustatomų būdų pagal šį išradimą. Šarnyro srityje amino rūgščių seka taip pat gali būti pakeista.

Optimaliausiame variante šarnyro sritis modifikuojama taip, kad
jame būtų pirminės amino rūgščių sekos, turinčios mažas,
neutalias grandines, tokias kaip alaninas ar treoninas. Tada
sintetinamas toks modifikuotas rekombinantinis serino proteazės
5 inhibitorius. Modifikacijos gali būti atliktos taikant standartinę
kryptingos mutagenezės techniką, kuri yra gerai žinoma
specialistams.

Šio išradimo variante šis būdas yra taikomas ACT analogų
pagaminimui. ACT nuo kitų serpinų skiriasi unikalia savybe
10 susirišti su DNR. ACT randamas tam tikrų piktybinių ir
nepiktybinių ląstelių branduoliuose ir, kaip yra paskelbta,
inhibuoja DNR polimerazę alfa, DNR sintezę pralaidžiose žmogaus
karcinomos ląstelėse ir poli-C-priklausančią primazę, bei
stimuliuoja poli dT priklausančią primazę. Neseniai buvo atrasta,
15 kad lizino liekanos, esančios dviejose trumpose rACT srityse yra
svarbios DNR surišimui. rACT turi du elementus: lizinų seką
(liekanos 210-212) ir C galinį peptidą 390-398, turintį du lizinus,
kurie dalyvauja DNR surišimo sąveikoje. Pakeitus lizinus 210-212
glutamatais ar treoniniais, visiškai prarandamas sugebėjimas
20 susirišti su DNR. Susirišimo su DNR aktyvumas iš dalies yra
išlaikomas, pakeitus tikrai vieną iš šių dviejų lizinų treoninu.
Atsižvelgus į C-galinį peptidą, buvo nustatyta, kad K396,
reaktyviausio rACT lizino, acetilinimas sumažėja, dalyvaujant DNR,
ir šių dviejų lizinų, K391 ir K396, pakeitimas treoninu sukuria
25 baltymą, pasižyminti labai sumažintu sugebėjimu susirišti su DNR.
Todėl, gaminant ir selekcionuojant rekombinantinio ACT analogus,
kitos modifikacijos gali būti atliekamos lizinų 210-212 regione bei
C-galiniame peptide, 390-398, taip, kad pakistų inhibitoriaus DNR
-surišančios savybės.

Sąveikos tarp serpinų ir serino proteazių tyrimai parodė, kad konformaciniai pakitimai, lydintys serpino susirišimą su proteaze, yra svarbūs inhibuojant pasirinktos serino proteazės aktyvumą.

Šiame išradime taip pat pateikiamos kompozicijos, galinčios veiksmingai pakeisti serino proteazės aktyvumą. Šio išradimo kompoziciją sudaro rekombinantinis serino proteazės inhibitorius, turintis proteazę surišančio saito ir reaktyvios kilpos šarnyro srities modifikuotas amino rūgščių sekas. Tinkamiausiu atveju modifikuotą šarnyro srities amino rūgščių seką sudaro amino rūgštys, turinčios mažas ar neutralias šonines grandis, tokias, kaip alaninas ir treoninas. Šio išradimo kompozicijos yra ypač naudingos, reguliuojant uždegiminius procesus, priklausančius nuo serino proteazės kaupimosi ląstelėse ir audiniuose.

Šiame išradime taip pat pateikiamas serino proteazės aktyvumo pakeitimo ląstelėse ir audiniuose būdas. Šis būdas remiasi tuo, kad parenkama proteazė-taikinys, kuri kaupiasi audiniuose ar ląstelėse; gaminamas rekombinantinis serino proteazės inhibitorius, turintis proteazę surišančią sritį bei "šarnyro" sritį reaktyvaus centro kilpoje, kurie modifikuoja amino rūgščių seką taip, kad sąveika tarp inhibitoriaus ir proteazės-taikinio pakeičiama ir, veikiant ląsteles arba audinius modifikuotu serino proteazės inhibitoriumi, serino proteazės aktyvumas yra moduliuojamas. Pageidautina, kad šios serino proteazės inhibitoriaus šarnyro srities amino rūgščių seka būtų keičiama amino rūgštimis, turinčiomis mažas bei neutralias šonines grandis, tokias kaip alaninai ir treoninai.

Viename variante moduluotas serino proteazės aktyvumas yra chimazės aktyvumas. Šiuo atveju pageidautina, kad serino proteazės inhibitorius būtų žmogaus laukinio tipo α -1-

58

antichimotripsino analogas, turintis modifikuotą amino rūgštį 358 arba modifikuotas amino rūgštis 356-361.

Kitame variante moduluotas serino proteazės aktyvumas yra elastazės aktyvumas. Šiuo atveju pageidautina, kad serino
5 proteazės inhibitorius būtų žmogaus laukinio tipo α -1-antichimotripsino analogas, turintis modifikuotą amino rūgštį 358 arba modifikuotas amino rūgštis 356-361.

Iš esmės šis išradimas pateikia genų inžinerijos metodais gautus serino proteazės inhibitorius, kurie yra α -1-
10 antichimotripsino analogai. Šie analogai yra efektyvūs chimotripsino inhibitoriai. Pavyzdžiui, šiame išradime pateikiamas α -1-antichimotripsino analogas, kuriame amino rūgštis, atitinkanti laukinio tipo α -1-antichimotripsino alaniną, esantį 350 pozicijoje, yra pakeista argininu. Taip pat pateikiamas laukinio tipo α -1-
15 antichimotripsino analogas, kuriame amino rūgštys, atitinkančios Ala-Ala-Thr-Ala-Val-Lys-Ile-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu-Thr-Arg-Thr-Ile-Val (sekos identifikavimo Nr.: 31), esančios 349 - 368 laukinio tipo α -1-antichimotripsino amino rūgščių pozicijose yra pakeistos Gly-Thr-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-
20 Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Thr (sekos identifikavimo Nr.: 32). Šis analogas pavadintas rACT-P10P10'. Be to pateikiamas žmogaus laukinio tipo α -1-antichimotripsino analogas, kuriame amino rūgštys, atitinkančios Ala-Ala-Thr-Ala-Val-Lys-Ile-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu (sekos identifikavimo Nr.: 33), esančios 349 - 363
25 laukinio tipo α -1-antichimotripsino amino rūgščių pozicijose yra pakeistos Gly-Thr-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-Pro-Glu (sekos identifikavimo Nr.: 34) bei amino rūgštis valinas, esanti 368 pozicijoje, pakeista Ala. Šis analogas pavadintas rACT-P10P5'. Šiame išradime pateikiami analogai gali būti gaunami,

55

naudojant nukleotidų sekas, kurios atitinka čia nurodytus amino rūgščių pakeitimus. Baltymai, turintys amino rūgščių seką, turinčią daugiau ar kiek mažiau amino rūgščių, fragmentus, ar besiskiriančios viena ar keliomis amino rūgštimis nuo α -1-antichimotripsino analogų sekų, kurios pateikiamos šiame išradime, bei pasižyminčios antichimotripsino, anti-tripsino, anti-trombino, anti-žmogaus neutrofilų elastazės (ŽNE) aktyvumu, taip pat yra šio išradimo sudėtinė dalis.

Šis išradimas taip pat pateikia nukleino rūgščių sekas, koduojančias rekombinantinius serino proteazės inhibitorius, tarp jų minėtus α -1-antichimotripsino analogus, ekspresijos vektorius, apimančius šias nukleino rūgščių sekas, transformuotas šeimininko ląsteles, galinčias ekspresuoti šias nukleino rūgščių sekas, ląstelių kultūras, galinčias ekspresuoti rekombinantinius serino proteazės inhibitorius, tokius, kaip α -1-antichimotripsino analogus, kurie pateikti šiame išradime ir baltyminius preparatus, kurių sudėtyje yra rekombinantiniai serino proteazės inhibitoriai, tokie kaip α -1-antichimotripsino analogai.

Apskritai, rekombinantiniai serino proteazės inhibitoriai, tarp jų ir α -1-antichimotripsino analogai, sintetinami šeimininko ląstelėse transformuotose ekspresijos vektoriumi, kuris sudarytas iš nukleino rūgščių sekos, koduojančios tam tikrą rekombinantinį serino proteazės inhibitorių. Šeimininko ląstelės kultyvuojamos esant tokioms sąlygoms, kad nukleino rūgščių seka, koduojanti tam tikrą rekombinantinį serino proteazės inhibitorių, yra ekspresuojama. Kai susikaupia pakankamai šio produkto, inhibitorius yra išskiriamas iš ląstelių ar terpės, supančios ląsteles.

Šeimininko ląstelės ir ekspresijos vektoriai, tinkami naudoti šiame išradime gali būti įprastu būdu atrenkami taip, kad suformuotų ekspresijos sistemą, galinčią sintetinti rekombinantinius

serino proteazės inhibitorius, tokius kaip α -1-antichimotripsino analogus. Šeimininko ląstelės tinkamos naudoti šiame išradime gali būti prokarijų ar eukarijų ląstelės, kurios gali būti transformuotos taip, kad stabiliai išlaikytų ir ekspresuotų šiuos
5 rekombinantinius serino proteazės inhibitorius. Tarp tinkamų ląstelių gali būti bakterijų, mielių bei žinduolių ląstelės. Kai kaip ląstelės-šeimininkės yra naudojamos prokarijų ląstelės, nevyksta serino proteazės inhibitoriaus glikozilinimas. Tačiau netikėtai buvo pastebėta, kad šis, neglikolizintas serino proteazės inhibitorius,
10 žmogaus α -1-antichimotripsinas, pasižymi dideliais funkciniais panašumais su natyviu žmogaus serumo α -1-antichimotripsinu, todėl yra tikimasi, kad šie neglikolizinti rekombinantiniai serino proteazės inhibitoriai bus efektyvūs natyvių serino proteazės inhibitorių pakaitalai terapiniam vartojimui. *E.coli* bakterijos yra
15 plačiai naudojamos baltyminių produktų gamybai, kadangi ekspresija ir klonavimas gali būti greitai aptikti. Be to, sintezė *E.coli* ląstelėse yra lengvai prieinama, pakankamai pigi, nesunkiai pasiekama pramoninė fermentacija bei gryninamas baltymas. Ekspresijos vektoriaus, turinčio nukleino rūgščių seką, koduojančią
20 rekombinantinį serino proteazės inhibitorių, įterpimas į šeimininko ląstelę, gali būti atliktas įvairiais būdais, tokiais kaip veikimas kalcio chloridu ar ličio chloridu arba elektroporacija.

Ekspresijos vektorius, turintis nukleino rūgščių seką, koduojančią rekombinantinį serino proteazės inhibitorių, tokį kaip
25 žmogaus α -1-antichimotripsino analogą, turėtų turėti dar ir kitus transkripcijos ir translacijos kontrolės elementus, kurie efektyviai sulieti su nukleino rūgščių seką, koduojančią rekombinantinį serino proteazės inhibitorių, pavyzdžiui, prieš koduojančią sritį esantį promotorių, po kurio sektų translacijos-iniciacijos signalas,
30 sudarytas iš ribosomą surišančio saito bei iniciacijos kodono, ir po

koduojančios srities išsidėsčiusio transkripcijos terminacijos signalo. Transkripcijos bei transliacijos kontrolės elementai gali būti liguojami bet kuria funkcinė kombinacija bei tvarka. Transkripcijos ir transliacijos kontrolės elementai, naudojami bet
 5 kuriame šio išradimo konkrečiame variante, parenkami, atsižvelgiant į ląstelių, į kurias bus įterpiamas ekspresijos vektorius, tipą, taip kad būtų sukurta ekspresijos sistema.

Naudinga naudoti stiprų promotorių, tokių, kaip *E.coli* trp-lac promotorių ar T7 P_L promotorių, tam, kad būtų užtikrintas aukštas
 10 baltyminio produkto ekspresijos lygis. Pastebėta, kad naudojant P1Nomp ir β-laktamazės promotorius, gaunama maža α-1-antichimotripsino išėiga arba apskritai jos negaunama, esant efektyviai sąveikai su DNR, koduojančia α-1-antichimotripsiną. Taip pat naudinga naudoti indukcinį promotorių, tokių kaip P_L
 15 promotorius, kad būtų išvengta toksinio poveikio šeimininkui, kuris gali atsirasti šio produkto kaupimosi ląstelėje metu.

Kaip alternatyvą, galima naudoti genų ekspresijos sistemą, kurios sudėtyje yra bakteriofagas T7 RNR polimerazė, aprašytas Studier ir Moffatt, J.Mol.Biol. 1986 189:113-130. Šioje sistemoje
 20 *E.coli* ląstelės transformuotos plazmidėmis, kuriose yra baktriofago T7 promotorius, veiksmingai sulietas su nukleino rūgščių seka, koduojančia pasirinktą serino proteazės inhibitorių, yra užkrečiamas fagu liambda, turinčiu T7 RNR polimerazės ekspresuojamą geną. Ląstelės užkrečiamos fagu, po to kai
 25 šeimininko ląstelėje susikaupia pakankamas plazmidės kopijų kiekis, tokiu būdu baltymo sintezė prasideda netrukus po užkrėtimo.

Transformuotos šeimininko ląstelės, turinčios nukleino rūgščių seka, koduojančią rekombinantinį serino proteazės
 30 inhibitorių, gali būti auginamos tinkamoje terpėje. Tais atvejais, kai

naudojamas indukcinis promotorius, šeimininko ląstelės auginamos tol, kol pasiekiamas didelis jų tankis ir promotorius pradeda sulieto baltymo bei proteazės ekspresiją. Tais atvejais, kai promotorius yra ne indukcinis, prasideda konstitucinė baltymo sintezė. Konstitucinė šių inhibitorių sintezė yra veiksminga tik tokiose ekspresijos sistemose, kai jos, iš esmės, yra netoksiškos šeimininko ląstelėms. Šios ląstelės gali būti auginamos tol, kol nedidėja produkto sintezė arba kol santykis tarp sunaudotų mitybinių medžiagų ir produkto sintezės yra žemesnis už nustatytą lygį, kuriam esant ląstelės surenkamos, lizuojamos, ir atpalaiduojamas baltymas, kuris gryninamas, naudojant tinkamą metodiką.

Kaip minėta, transformuotos šeimininko ląstelės, į kurias įterptas atitinkamas ekspresijos vektorius, ir tokių ląstelių kultūros, gali būti naudojamos šio išradimo rekombinantinio serino proteazės inhibitorių sintezei. Rekombinantinio serino proteazės inhibitoriaus baltymų preparatai taip pat gali būti gaunami, naudojant šeimininko ląsteles ir ląstelių kultūras.

Šeimininko ląstelės kultyvuojamos terpėje, tinkamoje auginti šias ląsteles bei pagaminti ląstelių ir terpės, kurioje yra rekombinantinis serino proteazės inhibitorius, mišinį. Arba, mišinys gali būti gryninamas. Gryninimui galima naudoti toliau išvardintus metodus, kurie nėra vieninteliai: jonų mainų chromatografiją, afininę chromatografiją, elektroforezę, dializę ir kitus baltymų gryninimo metodus, naudojamus praktikoje. Iš šeimininko ląstelių gaminami baltymų preparatai, kurių sudėtyje yra išgrynintų arba neišgrynintų rekombinantinių serino proteazės inhibitorių. Šių preparatų sudėtyje yra rekombinantinių serino proteazės inhibitorių bei, turbūt, kitų medžiagų iš ląstelių bei terpės mišinio, priklausomai nuo baltymo išgryninimo laipsnio.

63

Šis išradimas pateikia rekombinantinio serino proteazės inhibitorių, tokių kaip žmogaus α -1-antichimotripsino analogų, gavimo būdą, kuris apima šeimininko ląstelių, ekspresuojančių rekombinantinį serino proteazės inhibitorių, kultyvavimą bei optimalų mišinio gryninimą, tam, kad būtų gauta rekombinantinio serino proteazės inhibitoriaus išgryninta forma.

Terminas "išgrynintas" naudojamas šio išradimo nukleino rūgščių sekos būsenos apibūdinimui reiškia, kad nukleino rūgščių seka yra iš esmės išvalyta nuo nukleino rūgščių, nekoduojančių rekombinantinio serino proteazės inhibitoriaus bei kitų medžiagų, kurios esant normalioms sąlygoms yra susijusios su nukleino rūgštimis nerekombinantinėse ląstelėse. Terminas "išgrynintas" arba "išgryninta forma" naudojamas rekombinantinio serino proteazės inhibitoriaus baltymo būsenos apibūdinimui reiškia, kad rekombinantinis serino proteazės inhibitorius yra išvalytas, arba bent tam tikru laipsniu išvalytas nuo ląstelinių komponentų. Geriausia, kai rekombinantinio serino proteazės inhibitoriaus grynumas arba homogeniškumas yra nuo 20 % iki 100 %. Dar geriau, kai grynumas siekia 50 % arba dar daugiau.

Serino proteazės inhibitoriai, susintetinti pagal šį išradimą, gali būti naudojami gydyti ligas, susijusias su nenormalia proteazių ar jų inhibitorių funkcija. Pavyzdžiui, serino proteazės, tokios kaip elastazė, katepsinas G, chimazė ir triptazė yra susijusios su fagocitoze. Nenormali šių proteazių ar jų inhibitorių funkcija yra susijusi su uždegimu, emfizema, suaugusių kvėpavimo distreso sindromu (SKDS) bei reumatoidiniu artritu. Serino proteazės, tokios kaip tripsinas, chimotripsinas, elastazė ir enterokinazė dalyvauja virškinime. Nenormali šių proteazių ar jų inhibitorių funkcija stebima sergant pankreatitu. Serino proteazės, tokios kaip plazminas bei plazminogeno aktyvatorius yra susijusios su

fibrinolize. Nenormali šių proteazių ar jų inhibitorių funkcija yra susijusi su navikų skverbimusi į aplinkinius audinius. Serino proteazės, tokios kaip faktorius IXI, faktorius Xa, faktorius XIa, faktorius XIIa, faktorius VIIa, trombinas, aktyvuotas baltymas C ir plazmos kalikreinas dalyvauja kraujo krešėjime. Sutrikusi bet kurių šių proteazių ar jų inhibitorių funkcija yra susijusi su krešulių atsiradimu kraujagyslėse, insultu bei širdies kraujagyslių infarktu. Serino proteazės, tokios kaip faktorius Clr, faktorius Cls, faktorius D, faktorius B ir C3 konvertazė dalyvauja komplemento aktyvacijoje. Nenormali šių proteazių ar jų inhibitorių funkcija yra susijusi su reumatoidiniu artritu ar uždegimu. Serino proteazės, tokios kaip audinių kalikreinas ir post-proliną skaidantys fermentai dalyvauja hormono gamyboje bei degradacijoje. Nenormali šių proteazių ar jų inhibitorių funkcija yra susijusi su uždegimu. Serino proteazės, tokios kaip plazminas, plazminogeno aktyvatorius bei akrosinas dalyvauja ovuliacijoje ar apvaisinime. Šių proteazių ar jų inhibitorių funkcija yra susijusi su apvaisinimo kontrole. Nuo ATP-priklausančios proteazės dalyvauja baltymų apykaitoje. Anomalijos, susijusios su šiomis proteazėmis bei jų inhibitoriais, turi įtakos raumenų degradacijai bei karščiavimui.

Šio išradimo rekombinantiniai serino proteazės inhibitoriai yra taikomi pacientui bet kuriuo veiksmingu kiekiu dalyvaujant tinkamam nešikliui. "Efektyvus kiekis" reiškia tokią rekombinantinio serino proteazės inhibitoriaus koncentraciją, kuri gali moduluoti pasirinktos proteazės aktyvumą. Šis kiekis gali būti nustatomas vienu iš žinomų metodų, atsižvelgiant į paciento svorį, amžių ir klinikinę būseną. Tinkami farmaciniai nešikliai yra gerai žinomi ir aprašyti, pvz.: Gennaro, Alfonso, ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA, kuris yra standartinis šaltinis šioje srityje. Tinkami

farmaciniai nešikliai yra parenkami, atsižvelgiant į ketinamą vartojimo būdą ir standartinę farmacinę praktiką. Šios kompozicijos gali būti taikomos bet kuriuo tinkamu būdu, tarp jų (bet ne vien tik tai) intraveniniu būdu, *per os*, į pilvo ertmę, į raumenis, po oda, išoriškai, o taip pat per epitelinius audinius bei gleivinę, pvz.: per nosį, į burną, intravaginaliai, į analinę angą bei per virškinamąjį traktą. Veikliosios medžiagos bei nešiklio santykis natūraliai priklausys nuo cheminės prigimties, tirpumo bei rekombinantinio serino proteazės inhibitoriaus stabilumo. Kompozicijos paruoštos pagal šį išradimą, gali būti taikomos atskirai arba kombinacijoje su kitais junginiais, įskaitant (bet ne tik): kitus rekombinantinius serino proteazės inhibitorius, antikūnus, toksinus ir antisensinius oligonukleotidus. Šios kompozicijos taip pat yra naudingos diagnozuojant ir gydant pacientus, kuriems trūksta laukinio tipo serino proteazės inhibitoriaus. Giminingas α 1-antitripsino (ACT) trūkumas, t.y. toks trūkumas, kai koncentracija plazmoje yra mažiau nei 64%, lyginant su normalia, buvo tiriamas pacientuose ir jų giminėse, turinčiuose dalinį trūkumą - mažiau nei 50%. Šeši iš aštuonių pacientų su ACT trūkumu, kurie buvo vyresni nei 25 metų amžiaus, turėjo kepenų sutrikimų, kai tuo tarpu trys iš aštuonių pacientų su ACT trūkumu turėjo plaučių sutrikimų. Šie reiškiniai svyravo nuo sunkios ligos formos iki nedidelių, laboratorinių tyrimų metu pastebimų sutrikimų, kurie, matyt, siejasi su nenormalia ACT ekspresija, atsirandančia dėl delecijos vienos ar dviejų alelių, esančių ACT koduojančiame gene, sukeliančių nekontroliuojamą Chtr. proteazės aktyvumo pakitimą (Eriksson et al., *Acta Med Scand* 1986, 220, 447). Du defektyvūs žmogaus α 1-antichimotripsino (ACT) geno mutantai taip pat turi įtakos lėtinės obstrukcinės plaučių ligos (COPD) atsiradimui (Poller, W. et al., *Genomics* 1993, 17, 740). Leucino, esančio 55 pozicijoje pakeitimas

prolinu, lemiantis defektyvų ACT alelį, buvo pastebėtas šeimoje, kurioje trys kartos sirgo COPD. Kita mutacija - prolino, esančio 229 pozicijoje, pakeitimas alaninu siejosi su ACT trūkumu serume keturiems pacientams, kurių šeimos istorijoje yra buvę šios ligos atvejų. Kiekvienoje iš šių mutacijų fiziologiniai pokyčiai, atsiradę dėl mutacijos, gali būti susilpninti, jei šis trūkumas diagnozuojamas anksti ir yra atitinkamai gydomas. Šių mutacijų nustatymas, naudojant gerai žinomas PCR ar RT-PCR metodus, ir koreliacija su šio išradimo rekombinantiniais serino proteazės inhibitoriais palengvina tokių sąlygų diagnozę. Be to, šio išradimo kompozicijos yra naudingos tokių trūkumų gydymui.

Toliau pateikiami pavyzdžiai šio išradimo iliustravimui.

PAVYZDŽIAI

15

1 PAVYZDYS: ACT analogų konstravimas ir gryninimas.

Pradedant ACT ekspresijos vektoriumi, pACT, ir naudojant standartinę, kryptingos mutagenezės techniką, unikalus KpnI restrikcijos saitas buvo sukurtas pozicijoje, atitinkančioje P10-P9, keičiant Ala-Ala į Gly-Thr ir MluI restrikcijos saitas buvo sukurtas P10'-P11' srityje, keičiant Val į Thr. rACT varianto, koduojamo minėto ekspresijos vektoriaus, asociacijos greičio konstanta yra $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{S}^{-1}$ ir turi SI 1 ekvivalentą laukiniam tipui. Vėliau buvo sukurti kasetiniai variantai, pašalinus KpnI-MluI fragmentą ir vietoj jo įterpus sintetinį dvigrandį oligonukleotidą su parinktomis koduojančiomis sekomis. rACT-P10P10', rACT-P10P5'' ir rACT-OM mutantai buvo sukurti vektoriaus kasetėje.

Taškiniai mutantai rACT-T345R, rACT-A347R ir rACT-A350R buvo sukurti, taikant standartinę PCR metodą. Pora

64

komplementarių vidinių pradmenų, kurie kodavo specifinę mutaciją, buvo naudojami atskirai, poruojant atitinkamus jų išorinius pradmenis per dvi PCR reakcijas. Šios dvi PCR reakcijos davė dvi rūšis, kuriose buvo mutacijos vieta bei komplementarūs
5 galai. Dvi rūšys sumaišytos lygiomis moliarinėmis koncentracijomis buvo naudojamos, kaip mutantinis šablonas su dviem išoriniais pradmenimis PCR reakcijai mutanto geno amplifikavimui.

Taškiniai mutantai rACT-T345R, rACT-A347R ir rACT-A350R sukonstruoti šiuo būdu buvo tikrinami, nustatant nukleino rūgščių
10 seką.

Laukinis rACT tipas bei mutantai buvo išgryninti lizuojant bakterijas "prancūzišku presu", vėliau centrifuguojant ir anijonų mainų chromatografijos būdu, leidžiant supernatantą per kolonėlę, kuri buvo eliuota druskos gradientu. Aktyvi frakcija buvo perleista
15 per DNR celiuliozės kolonėlę ir eliuota druskoje. Išgrynintas produktas davė vieną juostą SDS-PAGE gelyje. Šiuo būdu paruoštos mutacijos yra parodytos Lentelėje 1.

Lentelė 1

Antichimotripsino reaktyvaus centro kilpos mutacijos

Sekos identifi- kavimo Nr.	Pavadinimas	Seka/mutacija				
		P10	P5	P1P1'	P5'	P10'
3	rACT (laukinis tipas)			TEASAATAVKITLLSALVETRRTIVRFN		
4	rACT-L358M			::::::::::::::::::M::::::::::::::::::		
5	rACT-L358R			::::::::::::::::::R::::::::::::::::::		
6	rACT-L358W			::::::::::::::::::W::::::::::::::::::		
7	rACT-V-P3'			::::::::::::::::::V::::::::::::::::::		
8	rACT-P3P3'			::::::::::::::::::IPMSIP::::::::::::::::::		
9	rACT-P6-P3			::::::::::::LEAIPMSIP::::::::::::::::::		
10	rACT-CAS			:::::GT::::::::::::::::::T:::::		
11	rACT-CAS-F			:::::GT::::::::::::::::::F::::::::::::::::::T:::::		
12	rACT-CAS-M			:::::GT::::::::::::::::::M::::::::::::::::::T:::::		
13	rACT-CAS-P3-P3'			:::::GT::::::::::::::::::IPMSIP::::::::::::::::::T:::::		
14	rACT- CAS-P3-P3'/L			:::::GT::::::::::::::::::IPLSIP::::::::::::::::::T:::::		
15	rACT- CAS-ElasW			:::::GT::::::::::::::::::VISAELW::::::::::::::::::T:::::		
16	rACT- CAS-Try			:::::GTMFLEAIPMSIPPE::::::::::::::::::T:::::		
17	rACT-P10P5'			:::::GTMFLEAIPMSIPPE::::::::::::::::::A:::::		
18	rACT-P10P10'			:::::GTMFLEAIPMSIPPEVKFNT:::::		
19	rACT-T345R			R::::::::::::::::::		
20	rACT-T347R			:::R::::::::::::::::::		
21	rACT-T350R			:::::R::::::::::::::::::		
22	rACT-PZM/P3P4'ΔP6'9'			:::::GTTAVKIIPMSIPPE/////T:::::		
23	rACT-PI-P3'R			::::::::::::::::::IPRSIP::::::::::::::::::		
24	rACT-Hep Cof II			::::::::::::::::::MPLSTQ::::::::::::::::::		
25	rACT-Anti-Thrombin			::::::::::::::::::AGRSLN::::::::::::::::::		
26	rACT-Ci inhibitorius			::::::::::::::::::VARTLL::::::::::::::::::		
27	rACT-PAI			::::::::::::::::::SARMAP::::::::::::::::::		
28	rACT-Anti-Plasmin			::::::::::::::::::MSRMSL::::::::::::::::::		
29	rACT-prot C inhi			::::::::::::::::::TFRSAR::::::::::::::::::		
30	α1PI (laukinis tipas)			TEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFT		

5

Šioje lentelėje žymėjimas ":" nurodo laukinio tipo amino rūgštį;

žymėjimas "/" nurodo amino rūgšties deleciją.

69

2 PAVYZDYS: Žmogaus neutrofilų elastazės aktyvumo inhibicija .

Žmogaus neutrofilų elastazės koncentracija buvo matuojama specifiniu aktyvumu laikant 0,0053 absorbcijos vienetus (410 nm)/min/pmol/ml su N-mMeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA, Sekos identifikavimo (ID) Nr: 1 (galutinė koncentracija 1,0 mM 1% Me₂SBSO) 100 mM Hepes, 500 mM NaCl, pH 7,5 kambario temperatūroje. Chtr aktyvumas buvo matuojamas specifiniu aktyvumu laikant 0,02 absorbcijos vienetus (410 nm)/min/pmol/ml su Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, Sekos ID Nr: 2 (galutinė koncentracija 0,2 mM 0,2% Me₂SO) 500 mM Tris-HCl, 0,025% Tx-100, pH 8,3 kambario temperatūroje. Inhibicijos stochiometrijos (SI) analizė buvo atlikta 1 ml, kuriame buvo 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 0,005% (t/t) Triton X-100 ir pastovus Chtr kiekis (apie 180 μM), keičiant rACT bei mutantų koncentraciją. Inhibicijos greitis rACT mutantais prieš Chtr buvo matuojamas, esant 25°C bei antros eilės sąlygoms reakcijos mišinyje, turinčiame ekvimoliarinę Chtr koncentraciją bei mutantus, pasižyminčius inhibiciniu aktyvumu. Duomenys, gauti šiuose eksperimentuose, yra parodyti lentelėje 2.

20

3 PAVYZDYS: Katepsino G aktyvumo inhibicija

Žmogaus neutrofilų katepsinas buvo gautas iš Athens Research and Technology, Inc (Atėnai, GA) ir naudojamas be tolesnio gryninimo. Katepsino G koncentracija buvo nustatyta, esant standartinėms analizės sąlygoms (0,1M Hepes, 7,5 ir 1mM Suc-AAPF-p-NA esant 37°C), specifiniu aktyvumu laikant 250 pmol produkto per minutę. Katepsino G reakcija (250 nM) su rACT variantais, buvo atlikta, esant 25°C 0,1-0,2 ml tirpalo, kuriame yra vienas iš šių buferių: FBT, pH 7,4; 0.1M Tris-HCl, pH 8,3; 1 M Tris-HCl, pH 7,0; 1,0 M

30

NaPi, pH 7,0 arba 1 M NaPi, pH 8,3. Inkubavus su įvairiais inhibitoriais kiekiais 15 - 20 minučių liekamasis aktyvumas buvo matuojamas spektrofotometru, pavyzdžio lygią dalį praskiedus (4-8 kartus) 0,8 ml standartinio analizės buferio, kuriame yra 4 mM substrato tirpalas Suc-AAPF-pNA. Substrato hidrolizės greitis buvo pastovus 2 minutes, per kurias buvo nustatomas liekamasis aktyvumas, nurodantis, kad katepsino G:ACT kompleksai buvo stabilūs praskiedimui. Duomenys, gauti šiuose eksperimentuose yra parodyti Lentelėje 2.

10

4 PAVYZDYS: Chimotripsino aktyvumo inhibicija

Chimotripsino (Chtr) aktyvumas buvo matuojamas, specifiniu aktyvumu laikant 0,02 absorbcijos vienetų (410 nm)/min/pmol/ml su Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, Sekos ID Nr: 2 (galutinė koncentracija 0,2 mM 0,2% Me₂SO) 500 mM Tris-HCl, 0,025% Tx-100, pH 8,3 kambario temperatūroje. Inhibicijos stochiometrijos (SI) analizė buvo atlikta 1 ml, kuriame buvo 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 0,005% (t/t) Triton X-100 ir pastovus Chtr kiekis (apie 180 μM), keičiant rACT bei mutantų koncentraciją. Inhibicijos greitis rACT mutantais prieš Chtr buvo matuojamas, esant 25°C bei antros eilės sąlygoms reakcijos mišinyje, turinčiame ekvimoliarinę Chtr koncentraciją bei mutantus, pasižyminčius inhibiciniu aktyvumu. Duomenys, gauti šiuose eksperimentuose yra parodyti Lentelėje 2.

25

5 PAVYZDYS: Chimazės aktyvumo inhibicija

Chimazė buvo išgryninta ir jos koncentracija nustatyta pagal Schechter et al., J.Biol.Chem. 1993, 268, 23626. Chimazės inhibicija įvairiais rACT inhibitoriais buvo nustatyta titruojant. Chimazė (200

30

nM) buvo titruojama su didėjančiais rACT variantų kiekiais, reakcijos mišiniuose, turinčiuose nuo 1 iki 2 M NaCl/0.1M Tris-HCl su 0,01% Triton X-100, pH 8,0, esant 25°C. Tai buvo atlikta, naudojant kelias reakcijas nuo 50 iki 100µl viso tūrio, kuriame buvo identiškas chimazės kiekis ir įvairūs rACT variantų kiekiai. Liekamasis aktyvumas buvo nustatytas po atitinkamo inkubacijos periodo, pašalinus lygią dalį iš kiekvienos reakcijos, atskiedus iki 1 ml analizės buferiu kuriame buvo 1 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa (sekos identifikavimo Nr.:2) substrato ir tiriant pNA atpalaidavimą spektrofotometriškai, esant 410 nm 3 minutes. Substrato hidrolizės greitis buvo pastovus visą 3 minučių stebėjimo periodą, o tai rodo, kad chimazės-ACT kompleksai buvo stabilūs praskiedimui ir kad liekamasis aktyvumas, nustatytas šiuo metodu, yra patikimas būdas nustatyti laisvą fermentą titravimo reakcijose. Duomenys buvo išreikšti frakcinio aktyvumo vienetais ir palyginti su $[I]_0/[E]_0$ santykiu kiekvienoje reakcijoje, tam kad būtų nustatyta inhibicijos steichiometrija. Chimazės inhibicijos įvairiais rACT greičio konstanta (K_{obs}/I) buvo matuojama, esant pseudo-pirmos eilės sąlygoms ir substratui. Inhibitoriaus koncentracija buvo mažiausiai 10 kartų didesnė, nei fermento koncentracija padauginta iš SI. Šios inhibicijos greičio konstantos, paskaičiuotos pagal gautus duomenis, buvo patikslintos, atsižvelgiant į substrato buvimą, tam kad būtų gautos (K_{obs}/I) reikšmės. Eksperimentų duomenys pateikti 2 lentelėje.

LENTEĻĒ Nr.2

Antichimotripsino aktyvios kilpos mutacijos poveikis fermento inhibicijai

Sekos identifika- -vimo Nr.	Chimotripsino inhibicija	Katepsino G inhibicija	Chimazės inhibicija	Žmogaus Neutrofilelasta- zės inhibicija	Trombino inhibicija	Plazmino inhibicija
5	a	a	p	i	p	
	a	a	p	p		
	p	p	i		a	a
			v			
10	a		a			
	a	a	a	a		
	a			p		
	a	a	p	i	p	
15	v	v	p			
	a	a	p	p		
	a	a	a	a		
	a			i		
	i			i		
	i					
	p			i		

Sekos identifika- -vimo Nr.	Chimotripsino inhibicija	Katepsino G inhibicija	Chimazės inhibicija	Žmogaus Neutrofilelasta- zės inhibicija	Trombino inhibicija	Plazmino inhibicija
18	p			i		
19	i	i		i		
22	a			a		
30				a		

5 Lentelėje Nr.2:

"v" reiškia labai aktyvų, aktyvesnis už bet kurį natūralų serpino inhibitorių;

"a" reiškia aktyvų;

"p" reiškia nevisišką aktyvumą; ir

"i" reiškia neaktyvų.

23

74

SEKŲ SĄRAŠAS

(1) BENDRA INFORMACIJA:

- (i) PAREIŠKĖJAI: Harvey Rubin, Barry Cooperman, Norman Schecter, Michael Plotkin, Zhi Wang
- (ii) IŠRADIMO PAVADINIMAS: Rekombinantinių serino proteazės inhibitorių gamybos būdas ir panaudojimas
- (iii) SEKŲ SKAIČIUS: 34
- (iv) SUSIRAŠINĖJIMO ADRESAS:

(A) ADRESATAS: Jane Massey Licata, Esq.

(B) GATVĖ: 210 Lake Drive East, Suite 201

(C) MIESTAS: Cherry Hill

(D) VALSTIJA: NJ

(E) ŠALIS: JAV

(F) ŠALIES KODAS: 08002

(v) KOMPIUTERINĖ FORMA

(A) VIDUTINIS TIPAS: DISKETĖ, 3.5 COLIO, TALPA 1.44 Mb

(B) KOMPIUTERIS: IBM 486

(C) OPERACINĖ SISTEMA: "WINDOWS FOR WORKGROUPS"

(D) REDAKTORIUS: WORDPERFECT 5.1.

(vi) ŠIOS PARAIŠKOS DUOMENYS:

(A) PARAIŠKOS NUMERIS:

70

(C) KLASIFIKACIJA:

(vii) ANKSTESNĖS PARAIŠKOS DUOMENYS:

(A) PARAIŠKOS NUMERIS: 276 936

(B) PATEIKIMO DATA: 1994.07.19

(A) PARAIŠKOS NUMERIS: 221 078

(B) PATEIKIMO DATA: 1994.03.31

(A) PARAIŠKOS NUMERIS: 221 171

(B) PATEIKIMO DATA: 1994.03.31

(A) PARAIŠKOS NUMERIS: 005 908

(B) PATEIKIMO DATA: 1993.01.15

(A) PARAIŠKOS NUMERIS: 735 335

(B) PATEIKIMO DATA: 1991.07.24

(viii) INFORMACIJA APIE PATENTINĮ PATIKĖTINĮ/AGENTĄ:

(A) VARDAS. PAVARDĖ: Jane Massey Licata

(B) REGISTRACIJOS NUMERIS: 32 257

(C) NUORODOS/SĄRAŠO NUMERIS: PENN-0107

(ix) TELEKOMUNIKACINIŲ RYŠIŲ DUOMENYS:

(A) TELEFONAS: (609) 779-2400

(B) FAKSAS: (609) 779-8438

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 1

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

76

- (A) ILGIS: 4
- (B) TIPAS: Amino rūgštys
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 1:
Ala Ala Pro Val

1

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 2

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 4
- (B) TIPAS: Amino rūgštys
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 2:
Ala Ala Pro Phe

1

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 3

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 27
- (B) TIPAS: Amino rūgštys
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 3:

Thr Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ala Val Lys Ile Thr Leu Leu Ser

1

5

10

15

Ala Leu Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn

20

25

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 4

77

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 4:

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Met	Ser
1				5					10				15	
Ala Leu Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn														
						20					25			

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 5

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 5:

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Arg	Ser
1				5					10				15	
Ala Leu Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn														
						20					25			

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 6

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 6:

Thr Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ala Val Lys Ile Thr Leu Trp Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn
 20 25

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 7

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 7:

Thr Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ala Val Lys Ile Thr Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Val Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn
 20 25

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 8

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 8:

Thr Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ala Val Lys Ile Ile Pro Met Ser
 1 5 10 15
 Ile Pro Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn
 20 25

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 9

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

79

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 9:

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Ala	Ile	Pro	Met	Ser
1				5				10						15
Ile	Pro	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn			
					20				25					

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 10

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 10:

Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Leu	Ser
1					5				10					15
Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Thr	Arg	Phe	Asn			
					20				25					

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 11:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 11:

Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Phe	Ser
1					5				10					15
Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Thr	Arg	Phe	Asn			
					20				25					

80

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 12:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 12:

Thr Glu Ala Ser Gly Thr Thr Ala Val Lys Ile Thr Leu Met Ser

1 5 10 15

Ala Leu Val Glu Thr Arg Thr Ile Thr Arg Phe Asn

20

25

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 13

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 13:

Thr Glu Ala Ser Gly Thr Thr Ala Val Lys Ile Ile Pro Met Ser

1 5 10 15

Ile Pro Val Glu Thr Arg Thr Ile Thr Arg Phe Asn

20

25

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 14

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 14:

Thr Glu Ala Ser Gly Thr Thr Ala Val Lys Ile Ile Pro Leu Ser
 1 5 10 15
 Ile Pro Val Glu Thr Arg Thr Ile Thr Arg Phe Asn
 20 25

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 15

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 15:

Thr Glu Ala Ser Gly Thr Thr Ala Val Lys Val Ile Ser Ala Glu
 1 5 10 15
 Trp MetVal Glu Thr Arg Thr Ile Thr Arg Phe Asn
 20 25

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 16

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 16:

Thr Glu Ala Ser Gly Thr Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser
 1 5 10 15
 Ile Pro Pro Glu Thr Arg Thr Ile Thr Arg Phe Asn
 20 25

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 17

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 17:

Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Thr	Met	Phe	Leu	Glu	Ala	Ile	Pro	Met	Ser
1				5					10					15
Ile	Pro	Pro	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Ala	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 18

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 18:

Thr	Glu	Ala	Ser	Gly	Thr	Met	Phe	Leu	Glu	Ala	Ile	Pro	Met	Ser
1				5					10					15
Ile	Pro	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Thr	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 19:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 19:

Arg	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Leu	Ser
1				5					10					15
Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 20:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 20:

Thr	Glu	Arg	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Leu	Ser
1					5				10				15	
Ala Leu Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn														
					20				25					

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 21:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 21:

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Arg	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Leu	Ser
1					5				10				15	
Ala Leu Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn														
					20				25					

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 22:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 23

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 22:

Thr Glu Ala Ser Gly Thr Thr Ala Val Lys Ile Ile Pro Met Ser
 1 5 10 15
 Ile Pro Pro Glu Thr Arg Phe Asn
 20

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 23:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 23:

Thr Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ala Val Lys Ile Ile Pro Arg Ser
 1 5 10 15
 Ile Pro Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn
 20 25

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 24:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 24:

Thr Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ala Val Lys Ile Met Pro Leu Ser
 1 5 10 15
 Thr Gln Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn
 20 25

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 25:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

85

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 25:

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Ala	Gly	Arg	Ser
1				5					10					15
Leu	Asn	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn			
				20					25					

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 26:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 26:

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Val	Ala	Arg	Thr
1					5				10					15
Leu	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn			
					20				25					

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 27:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 27:

Thr	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Lys	Ile	Ser	Ala	Arg	Met
1					5				10					15
Ala	Pro	Val	Glu	Thr	Arg	Thr	Ile	Val	Arg	Phe	Asn			

20

25

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 28:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 28:

Thr Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ala Val Lys Ile Met Ser Arg Met

1 5 10 15

Ser Leu Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn

20

25

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 29:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 29:

Thr Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ala Val Lys Ile Thr Phe Arg Ser

1 5 10 15

Ala Arg Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn

20

25

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 30:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 27

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 30:

Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser
 1 5 10 15
 Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Thr
 20 25

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 31:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 20

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 31:

Ala Ala Thr Ala Val Lys Ile Thr Leu Leu Ser Ala Leu Val Glu
 1 5 10 15
 Thr Arg Thr Ile Val
 20

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 32:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 20

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 32:

Gly Thr Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu
 1 5 10 15
 Val Lys Phe Asn Thr
 20

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 33:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 15

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 33:

Ala Ala Thr Ala Val Lys Ile Thr Leu Leu Ser Ala Leu Val Glu

1 5 10 15

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ, IDENTIFIKAVIMO NR.: 34:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 15

(B) TIPAS: Amino rūgštys

(C) TOPOLOGIJA: linijinė

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKOS IDENTIFIKAVIMO NR.: 34:

Gly Thr Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu

1 5 10 15

89

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS:

1. Serino proteazės inhibitorių, galinčių efektyviai moduluoti serino proteazės aktyvumą, gamybos būdas, besiskiriantis tuo, kad:
- 5 a) nustato parinkto serino proteazės inhibitoriaus seką;
- b) identifikuoja minėtos serino proteazės inhibitoriaus reaktyvią kilpą, kurioje nustato pirmą amino rūgščių seką iš proteazę surišančios srities ir antrą amino rūgščių seką iš šarnyro srities;
- 10 c) modifikuoja pirmąją amino rūgščių seką iš proteazę surišančios srities tokiu būdu, kad yra pakeičiamas rekombinantinės serino proteazės inhibitoriaus selektyvumas kitoms proteazėms;
- 15 d) modifikuoja antrąją amino rūgščių seką šarnyro srityje tokiu būdu, kad rekombinantinės serino proteazės inhibitorius galėtų efektyviai moduluoti šios serino proteazės aktyvumą; ir
- e) sintetina tokiu būdu modifikuotą rekombinantinį serino proteazės inhibitorių.
- 20
2. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad antroji amino rūgščių seka minėtoje šarnyro srityje yra pakeista amino rūgštimis, turinčiomis nedideles ir neutralias šonines grandis.
- 25 3. Būdas pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad serino proteazės inhibitorius gali prisirišti ir prie DNR.
4. Kompozicijos, skirtos moduluoti serino proteazės aktyvumą, besiskiriančios tuo, kad jų sudėtyje yra rekombinantinis serino

proteazės inhibitorius, turintis reaktyvios kilpos proteazę surišančios srities ir šarnyro srities modifikuotas amino rūgščių sekas.

5. Kompozicija pagal 4 punktą, besiskirianti tuo, kad minėtos
5 modifikuotos amino rūgščių sekos šarnyro srityje yra amino rūgštys, kurios turi nedideles ir neutralias šonines grandis.

6. Kompozicija pagal 4 punktą, naudojama uždegiminio proceso reguliavimui ląstelėse ir audiniuose.

10

7. Serino proteazės moduliavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad:

a) parenka proteazę-taikinį, kuri kaupiasi audiniuose ar ląstelėse;

b) gamina rekombinantinį serino proteazės inhibitorių, turintį proteazę surišančią sritį bei šarnyro sritį reaktyvaus centro kilpoje, kuriuose
15 amino rūgščių seka modifikuota taip, kad sąveika tarp inhibitoriaus ir proteazės-taikinio pakeičiama;

c) ląsteles arba audinius, kuriuose kaupiasi uždegimo ląstelės, veikia modifikuotu serino proteazės inhibitoriumi taip, kad serino proteazės aktyvumas yra moduluojamas.

20

8. Būdas pagal 7 punktą, besiskiriantis tuo, kad modifikuota amino rūgščių seka šarnyro srityje turi amino rūgštis su nedidelėmis ir neutraliomis šoninėmis grandimis.

25 9. Diagnozės būdas, besiskiriantis tuo, kad tiriami pacientai, kuriems įtariama geno, koduojančio serino proteazės inhibitorių, mutacija, kuri sukelia nekontroliuojamą proteazės aktyvumo būseną, ir susidedantis iš šių pakopų:

a) biologinio pavyzdžio paėmimas iš pacientų, kuriems įtariama
30 nekontroliuojama proteazės aktyvumo būseną;

- b) serino proteazės inhibitoriaus, kuris susijęs su šiomis sąlygomis, identifikavimas
- c) mutacijų nustatymas gene, koduojančiame šį serino proteazės inhibitorių.

5

10. Būdas pagal 9 punktą, besiskiriantis tuo, kad ši sąlyga yra kepenų ir plaučių veiklos sutrikimai.

10 11. Gydyimo būdas, besiskiriantis tuo, kad juo gydomi sutrikimai, kylantys dėl serino proteazės veiklos, besiskiriantys tuo, kad pacientui skiriamas efektyvus rekombinantinės serino proteazės inhibitoriaus, turinčio proteazę surišančią sritį bei "šarnyro" sritį reaktyvaus centro kilpoje, kurie turi modifikuotas amino rūgščių sekas, kiekis.

15

12. Būdas pagal 11 punktą, besiskiriantis tuo, kad ši būseną yra uždegimas, apvaisinimo kontrolė, naviko ląstelių migracija, neurotropizmas, karščio šokas, ūmus miokardo infarktas, nudegimai, autoimuninės ligos, piktybiniai navikai, infekcijos arba kepenų 20 transplantato atmetimo reakcijos.

13. Molekulinių bei ląstelinių uždegimo mechanizmų slopinimo būdas, sumažinant audinių pažeidimą ląstelėse ar audiniuose, besiskiriantis tuo, kad ląsteles arba audinius veikia efektyviu 25 rekombinantinės serino proteazės inhibitoriaus, turinčio reaktyvaus centro kilpoje proteazę surišančios srities bei šarnyro srities modifikuotas amino rūgščių sekas, kiekiu.

14. Žmogaus laukinio tipo α -1-antichimotripsino analogas, kurio amino rūgštis, atitinkanti alaniną, esantį 350 laukinio tipo α -1-antichimotripsino amino rūgščių pozicijoje, yra pakeista argininu.
- 5 15. Žmogaus laukinio tipo α -1-antichimotripsino analogas, kurio amino rūgštys, atitinkančios Ala-Ala-Thr-Ala-Val-Lys-Ile-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu-Thr-Ile-Val, esančios nuo 349 iki 368 laukinio tipo α -1-antichimotripsino amino rūgščių pozicijoje, yra pakeistos Gly-Thr-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Thr.
- 10
16. Žmogaus laukinio tipo α -1-antichimotripsino analogas, kurio amino rūgštys, atitinkančios Ala-Ala-Thr-Ala-Val-Lys-Ile-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu, esančios nuo 349 iki 363 laukinio tipo α -1-antichimotripsino amino rūgščių pozicijoje, yra pakeistos Gly-Thr-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-Pro-Glu, bei amino rūgštis, atitinkanti Val esantį 368 pozicijoje, yra pakeista Ala.
- 15
17. Nukleino rūgščių seka, koduojanti žmogaus laukinio tipo α -1-antichimotripsino analogą, kuriame amino rūgštis, atitinkanti alaniną, esantį 350 tipo α -1-antichimotripsino amino rūgščių pozicijoje, yra pakeista argininu.
- 20
18. Ekspresijos vektorius, turintis nukleino rūgščių seka, aprašytą 17 punkte.
- 25
19. Ląstelė šeimininkė, ekspresuojanti nukleino rūgščių seka, aprašytą 17 punkte.

20. Nukleino rūgščių seka, koduojanti žmogaus laukinio tipo α -1-antichimotripsino analogą, kuriame amino rūgštys, atitinkančios Ala-Ala-Thr-Ala-Val-Lys-Ile-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu-Thr-Arg-Thr-Ile-Val, esančios nuo 349 iki 368 laukinio tipo α -1-antichimotripsino amino rūgščių pozicijoje, yra pakeistos Gly-Thr-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-Pro-Glu-Val-Glu-Lys-Phe-Asn-Thr.
21. Ekspresijos vektorius, turintis nukleino rūgščių seka, aprašytą 20 punkte.
22. Ląstelė šeimininkė, ekspresuojanti nukleino rūgščių seka, aprašytą 20 punkte.
23. Nukleino rūgščių seka, koduojanti žmogaus laukinio tipo α -1-antichimotripsino analogą, kurioje amino rūgštys, atitinkančios Ala-Ala-Thr-Ala-Val-Lys-Ile-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu, esančios nuo 349 iki 363 laukinio tipo α -1-antichimotripsino amino rūgščių pozicijoje, yra pakeistos Gly-Thr-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-Pro-Glu bei amino rūgštis, atitinkanti Val, esantį 368 pozicijoje, yra pakeista Ala.
24. Ekspresijos vektorius, turintis nukleino rūgščių seka, aprašytą 23 punkte.
25. Ląstelė šeimininkė, ekspresuojanti nukleino rūgščių seka, aprašytą 23 punkte.
26. Ląstelių kultūra, ekspresuojanti žmogaus laukinio tipo α -1-antichimotripsino analogą, kuriame amino rūgštis, atitinkanti

alaniną, esantį 350 tipo α -1-antichimotripsino amino rūgščių pozicijoje, yra pakeista argininu.

27. Ląstelių kultūra, ekspresuojanti žmogaus laukinio tipo α -1-
5 antichimotripsino analogą, kuriame amino rūgštys, atitinkančios
Ala-Ala-Thr-Ala-Val-Lys-Ile-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu-Thr-
Arg-Thr-Ile-Val, esančios nuo 349 iki 368 laukinio tipo α -1-
antichimotripsino amino rūgščių pozicijoje, yra pakeistos Gly-Thr-
Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-Pro-Glu-Val-Glu-Lys-
10 Phe-Asn-Thr.

28. Ląstelių kultūra, ekspresuojanti žmogaus laukinio tipo α -1-
antichimotripsino analogą, kuriame amino rūgštys, atitinkančios
Ala-Ala-Thr-Ala-Val-Lys-Ile-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu,
15 esančios nuo 349 iki 363 laukinio tipo α -1-antichimotripsino amino
rūgščių pozicijoje, yra pakeistos Gly-Thr-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-
Pro-Met-Ser-Ile-Pro-Pro-Glu bei amino rūgštis, atitinkanti Val,
esantį 368 pozicijoje, yra pakeista Ala.

20 29. Baltyminis preparatas, besiskiriantis tuo, kad baltymas yra
žmogaus laukinio tipo α -1-antichimotripsino analogas, kuriame
amino rūgštis, atitinkanti alaniną, esantį 350 tipo α -1-
antichimotripsino amino rūgščių pozicijoje, yra pakeista argininu.

25 30. Baltyminis preparatas, besiskiriantis tuo, kad baltymas yra
žmogaus laukinio tipo α -1-antichimotripsino analogas, kuriame
amino rūgštys, atitinkančios Ala-Ala-Thr-Ala-Val-Lys-Ile-Thr-Leu-
Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu-Thr-Arg-Thr-Ile-Val, esančias nuo 349 iki
368 laukinio tipo α -1-antichimotripsino amino rūgščių pozicijoje, yra

pakeistos Gly-Thr-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-Pro-Glu-Val-Glu-Lys-Phe-Asn-Thr.

31. Baltyminis preparatas, besiskiriantis tuo, kad baltymas yra
- 5 žmogaus laukinio tipo α -1-antichimotripsino analogas, kuriame amino rūgštys, atitinkančios Ala-Ala-Thr-Ala-Val-Lys-Ile-Thr-Leu-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu, esančias nuo 349 iki 363 laukinio tipo α -1-antichimotripsino amino rūgščių pozicijoje, yra pakeistos Gly-Thr-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-Pro-Glu bei amino
- 10 rūgštis, atitinkanti Val, esantį 368 pozicijoje, yra pakeista Ala.