FI0001075398

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 107539 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 31.08.2001

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7
C07K 14/00, C12N 15/12, 5/06, C12P 21/02

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 925131

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 11.11.1992

(24) Alkupäivä - Löpdag 11.03.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 11.11.1992

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan PCT/SE92/00150

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

15.03.1991 SE 9100799 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 •**Pharmacia & Upjohn Aktiebolag,** 112 87 Stockholm, SVERIGE, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •**Almstedt,Annelie B.,** Tegnergatan 45, 111 61 Stockholm, SVERIGE, (SE)
2 •**Gray,Eva Maria,** Bergsgatan 3, 112 23 Stockholm, SVERIGE, (SE)
3 •**Lind,Peter,** Ringgatan 47C, 752 27 Uppsala, SVERIGE, (SE)
4 •**Ljung,Catherine,** Rasgränd 17, 162 46 Vällingby, SVERIGE, (SE)
5 •**Sandberg,Helena Inga,** Igelkottsvägen 21, 161 37 Bromma, SVERIGE, (SE)
6 •**Spira,Jack,** Tottvägen 6, 171 35 Solna, SVERIGE, (SE)
7 •**Sydow-Bäckman,Mona,** Knopvägen 1, 133 44 Saltsjöbaden, SVERIGE, (SE)
8 •**Wiman,Helena,** Krukmakargatan 27, 118 51 Stockholm, SVERIGE, (SE)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä yhdistelmä-humaani-hyytymistekijä VIII:n johdannaisen valmistamiseksi ja menetelmässä käytettävä DNA-jakso, vektori ja isäntäsolu
Förfarande för framställning av rekombinant human-faktor-VIII-derivat och i förfarandet använda DNA-sekvens, vektor och värdcell

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism:DSM 6415 DSM, DSM 6416 DSM, DSM 6417 DSM

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Proc. Natl. Acad. Sci USA vol. 83 (1986) p. 2979-2983

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Biologisesti aktiivista yhdistelmä-humaanihyytymistekijä VIII -johdannaista koodittava DNA-jakso, joka käsittää ensimmäisen DNA-segmentin, joka koodittaa humaanihyytymistekijä VIII:n 90 kDa:n suuruista ketjua ja toisen DNA-segmentin, joka koodittaa humaani-hyytymistekijä VIII:n 80 kDa:n suuruista ketjua ja jossa mainitut segmentit on yhdistetty kytkijä-DNA-segmentillä, joka koodittaa lysiinistä tai arginiinista koostuvaa 2 - 10 aminohapon mittaista kytkijäpeptidiä; tällaisen DNA-jakson sisältävä yhdistelmä-ilmentämisvektori; yhdistelmä-ilmentämisvektorilla transformoituja eläimistä peräisin olevia isäntäsoluja; menetelmä yhdistelmä-humaanihyytymistekijä VIII:n johdannaisen valmistamiseksi; ja humaani-hyytymistekijä VIII -johdannainen, joka sisältää metalli-ionisidoksella yhteen liittyneen raskaan ketjun ja kevyen ketjun.

DNA-sekvens, vilken kodar för ett biologiskt aktivt rekombinant human-faktor-VIII-derivat, vilken omfattar ett första DNA-segment, vilket kodar för 90 kDa-kedjan av human-faktor-VIII och ett andra DNA-segment, vilket kodar för 80 kDa-kedjan av human-faktor-VIII, varvid nämnda segment sammanfogats med ett länkande DNA-segment, vilket kodar för en länkande peptid med 2 - 10 aminosyrarester, valda bland lysin och arginin; en rekombinant expressionsvektor, vilken omfattar en sådan DNA-sekvens; värdceller av animalt ursprung, transformerade med en sådan rekombinant expressionsvektor; ett förfarande för framställning av ett rekombinant human-faktor-VIII-derivat; och ett human-faktor-VIII-derivat, vilket innehåller den tunga kedjan och den lätta kedjan, förenade genom en metalljonbindning.

Menetelmä yhdistelmä-humaani-hyytymistekijä VIII:n johdannaisen valmistamiseksi ja menetelmässä käytettävä DNA-jakso, vektori ja isäntäsolu

Tämä keksintö liittyy biologisesti aktiivisia yhdistelmä-humaani-hyytymistekijä VIII:n johdannaisia koodittaviin DNA-jaksoihin, näitä DNA-jaksoja sisältäviin yhdistelmä-ilmentämisvektoreihin, näillä yhdistelmä-ilmentämisvektoreilla transformoituihin isäntäsoluihin ja yhdistelmä-humaani-hyytymistekijä VIII:n johdannaisten valmistamiseen soveltuviin menetelmiin. Tämä keksintö mahdollistaa humaani-hyytymistekijä VIII:n johdannaisen valmistamisen, joka käsittää kaksi metalli-ionisillalla yhteen liittynyttä polypeptidiä.

Keksinnön tausta

Klassinen hemofilia eli hemofilia A on yleisin periytyvistä verenvuototaudeista. Se on seurausta X-kromosomiin kytkeytyneestä veren hyytymistekijä VIII:n puutteesta, sen vaikutukset kohdistuvat yksinomaan miespuolisiin yksilöihin ja sitä esiintyy yhdestä kahteen yksilössä kutakin 10 000 yksilöä kohti. X-kromosomin vaurio siirtyy naispuolisten kantajien välityksellä, jotka eivät itse ole hemofiilisiä. Hemofilia A havaitaan kliinisesti epänormaalista verenvuototaipumuksesta ja ennen kuin käsittely hyytymistekijä VIII:n tiivisteillä tuli käytäntöön, oli vaikeaa hemofiliaa sairastavan yksilön elinikä alle 20 vuotta. Hemofiliapotilaiden tilaa kyettiin parantamaan huomattavasti käyttämällä plasmasta peräisin olevia hyytymistekijä VIII:n tiivisteitä. Keskimääräinen elinikä lisääntyi huomattavasti, jolloin useimmilla potilailla oli mahdollisuus elää enemmän tai vähemmän normaalia elämää. Plasmasta peräisin olevilla tiivisteillä ja niiden käytöllä on ollut tiettyjä ongelmia, joista vakavin on ollut virusten kulkeutuminen niiden välityksellä. Tähän mennessä AIDS:ia, B-hepatiittia ja ei A- eikä B-hepatiittia aiheuttavilla viruksilla on ollut vakava vaikutus tähän populaatioon. Vaikka viime aikoina onkin kehitetty erilaisia viruksia

inaktivoivia menetelmiä ja uusia erittäin puhdistettuja hyytymistekijä VIII:n tiivisteitä, ei voida taata sitä, että niissä ei ole viruskontaminaatiota. Hyytymistekijä VIII:n tiivisteet ovat myös melko kalliita, koska raakamateriaalina käytetyn humaaniplasman saatavuus on rajoitettua. On todennäköistä, että suurin osa hemofilia A:n hoitoon käytettävien plasmasta peräisin olevien hyytymistekijä VIII:n tiivisteiden käyttöön liittyvistä ongelmista kyetään ratkaisemaan lähes kokonaan yhdistelmämateriaalista peräisin olevalla hyytymistekijä VIII -tuotteella, ja useiden tutkimusryhmien työskentely kohdistuu tällaisen tuotteen kehittämiseen. Yhdistelmä-hyytymistekijän kehittämisessä on kohdattu joitakin vaikeuksia, ongelmana on esimerkiksi ollut sellaisten tuotantotasojen saavuttaminen, joissa erityisesti täysimittaisen molekyylin saannot olisivat riittävän korkeita.

On osoitettu, että proteaasi-inhibiittorien läsnä ollessa valmistetussa tuoreessa plasmassa hyytymistekijä VIII:n moolimassa on 280 kDa ja se koostuu kahdesta polypeptidiketjusta, joiden suuruus on 200 kDa ja 80 kDa [Andersson, L-O., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 2979 - 2983]. Nämä ketjut pysyvät yhdessä metalli-ionisiltojen avulla. Enemmän tai vähemmän proteolyyttisesti pilkkoutuneita hyytymistekijä VIII -molekyylin muotoja on löydetty aktiivisina fragmentteina hyytymistekijä VIII:aa sisältävässä materiaalissa, joka on puhdistettu kaupallisista tiivisteistä [Andersson, L-O., et al., ibid.; Andersson, L-O., et al., (1985) EP 0 197 901]. Hyytymistekijä VIII:n pilkkoutunut muoto, jonka moolimassat ovat alueella 260 - 170 kDa, koostuu yhdestä raskaasta ketjusta, jonka moolimassa on alueella 180 - 90 kDa ja jonka kaikilla varianteilla on identtiset aminoterminaaliset päät, ja tämän kanssa yhdessä esiintyvästä yhdestä 80 kDa:n suuruisesta kevyestä ketjusta. Raskaan ketjun aminoterminaalinen alue on identtinen sellaisen yksiket-

juisen hyytymistekijä VIII:n polypeptidijakson kanssa, joka on päätelty hyytymistekijä VIII:n cDNA:n nukleotidisekvenssoinnin koetuloksista [Wood, W.I., et al., Nature 312 (1984) 330 - 336; Vehar, G.A., et al., Nature 312 (1984) 337 - 342].

Pienin hyytymistekijä VIII:n aktiivinen muoto, jonka moolimassa on 170 kDa ja joka koostuu yhdestä 90 kDa:n suuruisesta ja yhdestä 80 kDa:n suuruisesta ketjusta, voidaan aktivoida trombiinilla samassa määrin kuin tätä suuremman moolimassan omaavat muodot, joten se edustaa aktivoimatonta muotoa. Sen on osoitettu olevan biologisesti täysin aktiivista in vivo -olosuhteissa hemofiilisissä koirissa tutkittuna [Brinkhous, K.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 8752 - 8756]. Siten 170 kDa:n muoto vastaa hemostaattiselta tehokkuudeltaan hyytymistekijä VIII:n suurimoolimassaisia muotoja.

Se tosiseikka, että hyytymistekijä VIII:n polypeptidiketjun aminohappojen Arg-740 ja Glu-1649 välinen keskiosan runsaasti glykosyloitunut alue ei näytä olevan täydelliselle biologiselle aktiivisuudelle välttämätöntä, on saanut useat tutkijat yrittämään tätä aluetta vailla olevien yhdistelmä-hyytymistekijäjohdannaisten valmistamista. Tämä on tehty deletoimalla hyytymistekijä VIII:n keskiosassa sijaitsevaa runsaasti glykosyloitunutta aluetta koodittava cDNA joko kokonaan tai osittain.

Esimerkiksi julkaisussa J.J. Toole, et al. on raportoitu kaksi eri tapausta sellaisten hyytymistekijä VIII -molekyylien konstruktiosta ja ilmentämisestä, joista puuttuvat aminohapot 982 - 1562 ja 760 - 1639 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 5939 - 5942]. Julkaisussa D.L. Eaton et al. on raportoitu sellaisen hyytymistekijä VIII:n konstruktio ja ilmentäminen, josta puuttuvat aminohapot 797 - 1562 [Biochemistry 25 (1986) 8343 - 8347]. R.J. Kaufman on kuvannut sellaisen hyytymistekijä VIII:n ilmentämisen, josta puuttuvat aminohapot 741 - 1646 (PCT-

patenttihakemusjulkaisu nro WO 87/04 187). Julkaisussa N. Sarver et al. on raportoitu sellaisen hyytymistekijä VIII:n konstruktio ja ilmentäminen, josta puuttuvat aminohapot 747 - 1560 (DNA 6 (1987) 553 - 564). M. Pasek on raportoinut kaksi eri tapausta sellaisten hyytymistekijä VIII -molekyylien konstruktiosta ja ilmentämisestä, joista puuttuvat aminohapot 745 - 1562 ja aminohapot 741 - 1648 (PCT-patenttihakemusjulkaisu nro 88/00 831). K.-D. Lagner on raportoinut kaksi eri tapausta sellaisten hyytymistekijä VIII:n molekyylien konstruktiosta ja ilmentämisestä, joista puuttuvat aminohapot 816 - 1598 ja aminohapot 741 - 1689 [Behring Inst. Mitt. 82 (1988) 16 - 25, EP 295 597]. Julkaisussa P. Meulien et al. on raportoitu kaksi eri tapausta sellaisten hyytymistekijä VIII -molekyylien konstruktiosta ja ilmentämisestä, joista puuttuvat aminohapot 868 - 1562 ja aminohapot 771 - 1666, [Protein Engineering 2(4) (1988) 301 - 306, EP O 303 540 A1]. Ilmennettäessä näitä hyytymistekijä VIII:n cDNA:n muotoja nisäkässoluissa ovat tuotantopitoisuudet tyypillisesti 10 kertaa korkeampia hyytymistekijä VIII:aan verrattuna.

On lisäksi tehty yrityksiä ilmentää erikseen kahdesta eri cDNA-johdannaisesta peräisin olevia 90 kDa:n ja 80 kDa:n ketjuja samassa solussa [Burke, R.L., et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 12574 - 12578, Pavirani, A., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 145 (1987) 234 - 240]. Talteen saadun hyytymistekijä VIII:C:n aktiivisuuden palautuminen in vivo -olosuhteissa näyttää tässä systeemissä kuitenkin olevan tehokkuudeltaan rajoitettua.

Tässä keksinnössä kuvataan deletoituja hyytymistekijä VIII:n cDNA-molekyylejä, jotka koodaavat yhdistelmä-hyytymistekijän johdannaisia, joiden moolimassa ja muut biokemialliset ominaisuudet vastaavat aiemmin aikaansaatua plasman hyytymistekijä VIII:n muotoa, jota esiintyy huomattavissa määrin kaupallisissa tiivisteissä [Andersson, L-O. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 2979 -

2983]. On todennäköistä, että näillä uusilla deletoiduilla hyytymistekijä VIII:n cDNA-johdannaisilla saatavat yhdistelmä-hyytymistekijäproteiinin saannot ovat riittävän suuret näiden käyttöön teollisessa menetelmässä yhdistelmä-hyytymistekijä VIII:n farmaseuttiseksi valmistamiseksi.

Käytetyt määritelmät

Seuraavissa kappaleissa termin "hyytymistekijä VIII:n deleetiojohdannainen" määritelmänä on sellainen yksi tai useampi polypeptidiketju, jolla on hyytymistekijä VIII:C -aktiivisuutta ja joka on johdettu täysimittaisesta 2332 aminohapon suuruisesta hyytymistekijä VIII:n polypeptidistä deletoimalla aminohapot 741 - 1648 käsittävä segmentti ja korvaamalla mainittu segmentti ainakin kolmesta emäksisestä aminohaposta, toisin sanoen lysiinistä tai arginiinista, koostuvalla kytkijäsegmentillä. Termin "hyytymistekijä VIII:RE" määritelmänä on polypeptidiketju, joka on peräisin täysimittaisesta hyytymistekijä VIII:sta ja josta puuttuvat aminohapot 741 - 1648. Termin "hyytymistekijä VIII:QD" määritelmänä on polypeptidiketju, joka on peräisin täysimittaisesta hyytymistekijä VIII:sta ja josta puuttuvat aminohapot 745 - 1562. Termin "hyytymistekijä VIII:R3" määritelmänä on polypeptidi, josta puuttuvat aminohapot 741 - 1648 ja jossa mainitun segmentin tilalla on kaksi arginiiniryhmää. Termin "hyytymistekijä VIII:R4" määritelmänä on polypeptidi, josta puuttuvat aminohapot 741 - 1648 ja jossa mainitun segmentin tilalla on kolme arginiiniryhmää. Termin "hyytymistekijä VIII:R5" määritelmänä on polypeptidi, josta puuttuvat aminohapot 741 - 1648 ja jossa mainitun segmentin tilalla on neljä arginiiniryhmää.

Keksinnön kuvaus

Tässä keksinnössä käsitellään menetelmiä sellaisten proteiinien valmistamiseksi, joilla on hyytymistekijä VIII:C -aktiivisuutta. Tarkemmin sanottuna tästä keksinnöstä saadaan käyttöön täysimittaisesta hyytymistekijä VIII:n

cDNA:sta peräisin olevia modifioituja hyytymistekijä VIII:n cDNA-jaksoja, joista eläinsoluissa ilmennettäessä saadaan syntymään suurina pitoisuuksina proteiineja, joilla on hyytymistekijä VIII:C -aktiivisuutta ja jotka koostuvat olennaisesti kahdesta polypeptidiketjusta, joiden moolimassat ovat 90 kDa ja 80 kDa.

Tästä keksinnöstä saadaan siten käyttöön biologisesti aktiivista yhdistelmä-humaanihyytymistekijä VIII:n johdannaista koodaava DNA-jakso, jolle on tunnusomaista, että se käsittää ensimmäisen DNA-segmentin, joka koodittaa humaani-hyytymistekijä VIII:n aminohappoja 1 - 740, ja toisen DNA-segmentin, joka koodittaa humaani-hyytymistekijä VIII:n aminohappoja 1649 - 2332 ja mainitut segmentit yhdistää kytkijä-DNA-segmentti, joka koodittaa lysiinistä tai arginiinista koostuvaa ainakin kolmen ja korkeintaan noin kymmenen aminohapon mittaista kytkijäpeptidiä.

Vaikkakin mainitun kytkijä-DNA-segmentin koodittaman kytkijäpeptidin pituus ei ole ratkaiseva, on edullista, että se ei sisällä enempää kuin noin 10 aminohapporyhmää.

On erityisen edullista, että kytkijäpeptidi koostuu kolmesta tai neljästä aminohapporyhmästä. On erityisen edullista, että Glu-1649:ää edeltävä aminohapporyhmä on arginiini.

Tämän keksinnön mukaisesti on edullista, että kaikki kytkijäpeptidin muodostavat ryhmät ovat arginiiniryhmiä.

On huomattava, että kytkijäpeptidi muodostuu emäksisistä aminohapoista, nimittäin lysiini- ja/tai arginiiniryhmistä. Näistä ryhmistä ovat arginiiniryhmät edullisia.

Tämä keksintö liittyy myös sellaisen transkriptioyksikön sisältävään yhdistelmä-ilmentämisvektoriin, jolle on tunnusomaista, että se käsittää edellä kuvatun DNA-jakson ja lisäksi promoottorin ja polyadenylaatiosignaalijakson.

Tämä keksintö kattaa myös eläimistä peräisin olevat isäntäsolut, joille on tunnusomaista, että ne on transformoitu edellä esitetyllä yhdistelmä-ilmentämisvektorilla.

Tästä keksinnöstä saadaan lisäksi käyttöön menetelmä edellä esitetyn kuvauksen mukaisen biologisesti aktiivisen yhdistelmä-humaanihyytymistekijä VIII:n johdannaisen valmistamiseksi jolle menetelmälle on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 8 esitetään. Menetelmä käsittää sen, että viljellään edellä kuvatulla yhdistelmä-ilmentämisvektorilla transformoitua eläinsolulinjaa ravintoliuoksessa, joka mahdollistaa sellaisen humaanihyytymistekijä VIII:n johdannaisen ilmentämisen ja erittämisen, joka koostuu 90 kDa:n suuruisesta alueesta ja tähän metalli-ionisidoksella liittyneestä 80 kDa:n suuruisesta alueesta, ja että mainittu ilmennetty johdannainen otetaan tämän jälkeen talteen soluviljelyliuoksesta.

Keksinnön mukainen menetelmä mahdollistaa sellaisen humaanihyytymistekijä VIII:n johdannaisen valmistamisen, joka käsittää humaanihyytymistekijä VIII:n 90 kDa:n suuruisen ketjun ja metalli-ionin välityksellä tähän kytkeytyneen 80 kDa:n suuruisen ketjun ja jossa yhdistämiseen on käytetty vaihtoehtoisesti kytkijäpeptidiä tai tämän osaa.

Jotta kyettäisiin saamaan aikaan edellä olevat polypeptidiketjut käsittävä proteiini, jolla on hyytymistekijä VIII:C -aktiivisuutta, on in vivo -olosuhteissa suoritetussa translaatiossa muodostunut yhtenäinen polypeptidiketju pilkottava joko käyttäen biosynteesin aikaista posttranslationaalista prosessointia molekyyliä tuottavassa solussa tai käyttämällä in vitro -olosuhteissa tapahtuvaa proteolyyttistä prosessointia tai kumpaakin näistä. Koska humaaniplasmasta on eristettävissä hyytymistekijä VIII:C -aktiivisuutta omaava proteiini, joka käsittää kaksi polypeptidiketjua, joiden moolimassat ovat 200 kDa ja 80 kDa, otaksutaan yksiketjuisessa täysimittaisessa hyytymistekijä VIII:n primaarisessa translaatiotuotteessa esiintyvän sopiva prosessoivia entsyymejä vastaava pilk-

koutumiskohta. Tärkeä in vivo -olosuhteissa toiminnallinen prosessointikohta sijaitsee todennäköisimmin Arg-1648:n karboksiterminaalisella puolella. Proteolyyttisen maturaation aikana kohdalla Arg-1678 tapahtuvasta pilkkoutumisesta syntyy edellä mainituista 200 kDa:n ja 80 kDa:n moolimassaisista ketjuista koostuva hyytymistekijä VIII -proteiini. Koska Arg-1648 näyttää sijaitsevan hyytymistekijä VIII -molekyylissä olevien rakenteellisten alueiden välissä, se voi muodostaa prosessointientsyymin tai -entsyymien kohteen, johon pääsylle ei ole steerisiä esteitä. Toinen prosessointikohta voi olla kohdalla Arg-740, josta aiheutuu 200 kDa:n ketjun konversio 90 kDa:n ketjuksi in vitro -olosuhteissa, joka siten johtaa kaupallisissa humaaniplasmasta peräisin olevissa hyytymistekijä VIII -tiivisteissä hyytymistekijä VIII:n 90 kDa:n ja 80 kDa:n muotoihin. Tämän keksinnön mukaisesti on havaittu, että sellaisten hyytymistekijä VIII:n deleetiojohdannaisten valmistamiseksi, jotka voidaan prosessoida joko in vivo- tai in vitro -olosuhteissa kahdeksi moolimassoiltaan 90 kDa ja 80 kDa olevaksi polypeptidiketjuksi, voidaan täysimittaisessa hyytymistekijä VIII -proteiinissa olevia Arg-740 ja Glu-1649-ryhmää yhdistävä 908 aminohapon suuruinen polypeptidiketju korvata ainakin kolmella emäksisellä aminohapporyhmällä, toisin sanoen lysiini- tai argiiniiryhmillä tai näillä molemmilla. Glu-1649:n aminoterminaalisella puolella olevan aminohapon tulisi edullisesti olla argiiniiryhmä.

Edellisen esityksen mukaisten kaksi polypeptidiketjua sisältävien hyytymistekijä VIII -proteiinien tuotanto suurina pitoisuuksina sopivissa isäntäsoluissa vaatii sen, että hyytymistekijä VIII:n deleetion sisältävät johdannais-cDNA-molekyylit kootaan tehokkaiksi transkriptioyksiköiksi niihin yhdistettyine sopivine säätely-yksiköineen kloonausvektoriin, joka voidaan kasvattaa E. colissa alan ammattimiesten tuntemilla menetelmillä. Trans-

kription tehokkaat säätely-yksiköt voivat olla peräisin viruksista, joiden luonnollisia isäntiä ovat eläinsolut, tai ne voivat olla peräisin eläinsolujen kromosomaalisesta DNA:sta. Voidaan edullisesti käyttää promoottori-enhanseri-yhdistelmiä, jotka ovat peräisin Simian Virus 40:stä, adenoviruksesta, BK-polyomaviruksesta, ihmisen sytomegaloviruksesta tai Rous sarcoma -viruksen LTR-jaksosta (pitkästä terminaalisesta toistumajaksosta), tai voidaan käyttää promoottori-enhanseri-yhdistelmiä, joihin kuuluvat eläinsoluissa voimakkaasti transkriptioon konstitutiivisesti osallistuvat geenit, kuten beeta-aktiini tai GRP78. Jotta sellaisten mRNA-molekyylien pitoisuudet, joiden transkriptio tapahtuu hyytymistekijä VIII:n cDNA-molekyyleistä, kyettäisiin saamaan pysyvästi korkealle tasolle, tulisi transkriptioyksikön 3'-puoleisessa osassa olla transkription terminaatio-polyadenylaatiojaksoa koodittava DNA-alue. Tämä jakso on edullisesti peräisin Simian Virus 40:n varhaisessa vaiheessa transkriptoituvalta alueelta, kaniinin beeta-globiinigeenistä tai ihmisen kudosplasminogeeniaktivaattorigeenistä.

Tehokkaiksi transkriptioyksiköiksi kootut hyytymistekijä VIII:n cDNA-molekyylit viedään tämän jälkeen sopivaan isäntäorganismiin eri hyytymistekijä VIII -proteiinien ilmentämistä varten. Tämän organismin tulisi olla edullisesti eläinsolulinja, joka on peräisin selkärankaisista, jotta kyettäisiin varmistamaan, että sen ketjun laskostuminen, disulfidisidosten muodostuminen, asparagiiniin liittynyt glykosylaatio ja muut posttranslationaaliset modifikaatiot sekä erittyminen viljelyliuokseen tapahtuisivat oikealla tavalla. Esimerkkejä muista posttranslationaalisista modifikaatioista ovat tyrosiinin O-sulfataatio ja vastasyntyneen polypeptidiketjun proteolyyttinen prosessointi, joka on oleellista 90 kDa:n ja 80 kDa:n kaksiketjuisten hyytymistekijä VIII -molekyylien muodostumiselle. Esimerkkejä solulinjoista, joiden käyttö voi tulla

kyseeseen, ovat apinan COS-solut, hiiren L-solut, hiiren C127-solut, hamsterin BHK-21-solut, ihmisen alkion munuaisen 293-solut ja edullisesti CHO-solut.

Hyytymistekijä VIII:n cDNA-molekyylejä koodittavat transkriptioyksiköt voidaan viedä eläinsolulinjaan useita eri keinoja käyttäen. Voidaan esimerkiksi muodostaa yhdistelmämolekyylejä, joissa on edellä kuvattuja transkriptioyksiköitä ja eri eläinviruksiin perustuvia vektoreita. Esimerkkejä näistä ovat baculovirukseen, vacciniavirukseen, adenovirukseen ja edullisesti naudan papillomavirukseen perustuvat vektorit.

Hyytymistekijä VIII:n cDNA-molekyylejä koodittavat transkriptioyksiköt voidaan tuoda eläinsoluihin yhdessä jonkin muun yhdistelmägeenin kanssa, joka voi toimia dominanttina selektiomarkkerina näissä soluissa sellaisten spesifisten solukloonien eristämisessä käytettävänä apukeinona, joiden genomiin yhdistelmä-DNA on liittynyt. Esimerkkejä tämäntyyppisistä dominanteista selektiomarkkerigeeneistä ovat Tn5-aminoglykosidifosfotransferaasi, joka aiheuttaa resistenssin genetisiinille (G418), hygromysiinifosfotransferaasi, joka aiheuttaa hygromysiiniresistenssin, ja puromysiiniasetyylitransferaasi, joka aiheuttaa puromysiiniresistenssin. Tällaista selektiomarkkeria koodittava transkriptioyksikkö voi olla joko samassa vektorissa kuin se vektori, joka koodittaa hyytymistekijä VIII:n cDNA-molekyyliä tai se voi olla isäntäsoluun tuotavan ja tähän liittyvän erillisen vektorin koodittama, jolloin on usein tuloksena eri transkriptioyksiköiden sitoutuminen fysikaalisesti lujasti yhteen.

Muuntyyppiset selektoitavat markkerigeenit, joita voidaan käyttää yhdessä hyytymistekijä VIII:n cDNA-molekyylin kanssa, perustuvat erilaisiin transkriptioyksiköihin, jotka koodittavat dihydrofolaattireduktaasia (dhfr). Tämäntyyppisen geenin tuomisesta soluihin, joilta puuttuu endogeeninen dhfr-aktiivisuus ja jollaisia ovat edullises-

ti CHO-solut (DUKX-B11, DG-44), on seurauksena näiden solujen kyky kasvaa nukleosideja sisältämättömillä ravintoliuoksilla. Esimerkki tällaisesta mediumista on Hamin F12 -kasvatusliuos, josta puuttuvat hypoksantiini, thymidiini ja glysiini. Nämä dhfr-geenit voidaan tuoda yhdessä hyytymistekijä VIII:n cDNA-transkriptioyksiköiden kanssa edellistä tyyppiä oleviin CHO-soluihin joko samaan tai eri vektoriin liitettynä ja ne muodostavat siten yhdistelmähyytymistekijä VIII -proteiinia tuottavia dhfr-positiivisia solulinjoja.

Jos edellä kuvattuja solulinjoja kasvatetaan sytotoksisen dhfr-inhibiittorin, metotreksaatin, läsnä ollessa, syntyy uusia metotreksaatille vastustuskykyisiä solulinjoja. Näissä solulinjoissa voi yhdistelmä-hyytymistekijä-proteiinin tuotto olla nopeutunut, mikä johtuu kytkettyjen dhfr- ja hyytymistekijä VIII:n transkriptioyksiköiden lukumäärän lisääntymisestä. Kun näitä solulinjoja kasvatetaan lisääntyvissä metotreksaattikonsentraatioissa (1 - 10 000 nM), saadaan uusia solulinjoja, jotka tuottavat suuria määriä hyytymistekijä VIII -proteiinia.

Edellä kuvattuja hyytymistekijä VIII -proteiineja tuottavia solulinjoja voidaan kasvattaa suuressa mittakaavassa, joko suspensioviljelmässä tai erilaisilla kiinteillä kantaja-aineilla. Esimerkkejä näistä kantaja-aineista ovat dekstraani- tai kollageenimatriiseihin perustuvat mikrokantaja-aineet, tai ontelokuitujen muodossa olevat kiinteät kantaja-aineet tai erilaiset keraamiset materiaalit. Silloin kun edellä kuvattuja solulinjoja kasvatetaan suspensioviljelmässä tai mikrokantaja-aineiden pinnalla, tämä voidaan tehdä joko kertaviljelmänä tai perfuusioviljelmänä, jolloin solujen kasvatukseen käytettyä liuosta muodostuu pitkien ajanjaksojen kuluessa. Tämän keksinnön mukaisesti edellä kuvatut solulinjat soveltuvat mainiosti sellaisen yhdistelmä-hyytymistekijän tuotantoon tarkoitetun teollisen menetelmän kehittämiseen, joka vas-

taa ihmisen plasmasta eristettävissä olevaa autenttista kahdesta polypeptidiketjusta (90 kDa ja 80 kDa) koostuvaa hyytymistekijä VIII:aa.

Yhdistelmä-hyytymistekijä VIII -proteiini, joka kerääntyy edellisen tyyppisten CHO-solujen kasvatusliuokseen, voidaan konsentroida ja puhdistaa useilla erilaisilla biokemiallisilla menetelmillä mukaan lukien menetelmät, jotka perustuvat yhdistelmä-hyytymistekijä VIII -proteiinin ja solujen kasvatusliuoksessa olevien muiden aineiden välisiin eroihin koossa, varauksessa, hydrofobisuudessa, liukenevuudessa, spesifisessä affiniteetissa jne.

Esimerkki tällaisesta puhdistuksesta on yhdistelmä-hyytymistekijä-proteiinin adsorptio monoklonaaliseen vasta-aineeseen, joka on immobilisoitu kiinteän tukirakenteen pinnalle. Desorption jälkeen hyytymistekijä VIII -proteiini voidaan puhdistaa edellä mainittuihin ominaisuuksiin perustuvilla erilaisilla kromatografisilla menetelmillä.

Tässä keksinnössä kuvatut yhdistelmä-proteiinit, joilla on hyytymistekijä VIII -aktiivisuutta, voidaan formuloida terapeuttiseen käyttöön tarkoitetuiksi farmaseuttisiksi valmisteiksi. Puhdistetut hyytymistekijä VIII -proteiinit voidaan liuottaa tavanomaisiin fysiologisesti yhteensopiviin vesipitoisiin puskuriliuoksiin, joihin voidaan lisätä vaihtoehtoisesti farmaseuttisia lisäaineita farmaseuttisten valmisteiden aikaansaamiseksi.

Tätä keksintöä kuvataan seuraavaksi vielä yksityiskohtaisemmin käyttämällä tätä keksintöä rajoittamattomia esimerkkejä. Tämän keksinnön mukaiset erityiset sovellutusmuodot on kuvattu yhdessä oheistettujen piirrosten kanssa, joissa:

Kuvio 1 on kaaviokuva täysimittaisen hyytymistekijä VIII:n ja hyytymistekijä VIII:R3:n, hyytymistekijä VIII:R4:n ja hyytymistekijä VIII:R5:n suhteesta. Tässä kuviossa on esitetty primaarirakenne alueesta, joka sijaitsee 90

kDa:n ketjun C-terminaalisen pään (Arg-740) ja 80 kDa:n ketjun N-terminaalisen pään (Glu-1649) välillä.

Kuvio 2 on kuvaus plasmidista pKGE491, joka sisältää hyytymistekijä VIII:R3-cDNA:n, jonka transkriptiota ohjaa ihmisen sytomegaloviruksen promoottori.

Kuvio 3 on kuvaus plasmidista pKGE674, joka sisältää hyytymistekijä VIII:R4-cDNA:n, jonka transkriptiota ohjaa humaani-GRP78-promottori, ja lisäksi transkriptioyksikön, joka koodaa hiiren dihydrofolaattireduktaasin cDNA:ta, ja jonka transkriptiota ohjaa mouse mammary tumor -viruksen LTR-jakso.

Kuvio 4 on kuvaus plasmidista pKGE672, joka sisältää hyytymistekijä VIII:R5 -cDNA:n, joka on ihmisen GRP78-promoottorin transkriptiota säätelevän toiminnan alaisuudessa ja hiiren dihydrofolaattireduktaasin, joka on samanlainen kuin kuviossa 3 esitetty vektori.

Kuvio 5 on kuvaus plasmidista pKGE327, joka sisältää ainoastaan hiiren dihydrofolaattireduktaasi cDNA -transkriptioyksikön (vertaa kuvioon 3).

Kuvio 6 on kuvaus hyytymistekijä VIII:R3:n, hyytymistekijä VIII:R4:n, hyytymistekijä VIII:R5:n ja plasmasta peräisin olevan hyytymistekijä VIII:n immunoblottauksesta natriumdodekyylisulfaatin läsnä ollessa suoritetun polyakryyliamidigeelielektroforeesin jälkeen. Kanava A: plasman hyytymistekijä VIII, kanava B: hyytymistekijä VIII:R3, kanava C: hyytymistekijä VIII:R4, kanava D: hyytymistekijä VIII:R5, kanava ST: BRL:n edeltäkäsin värjätyt moolimassastandardit, suurimoolimassainen alue, jotka on hankittu Bethesda Research Laboratories -yhtiöstä.

Kuvio 7 esittää muutoksia yhdistelmä-hyytymistekijä VIII:R5:n hyytymistekijä VIII -aktiivisuudessa humaani-α-trombiinin kanssa suoritetun inkuboinnin jälkeen.

Kuvio 8 esittää muutoksia yhdistelmä-hyytymistekijä VIII:R5:n SDS-PAGE:n ja immunoblottauksen tuloksissa humaani-α-trombiinin kanssa suoritetun inkuboinnin jälkeen

(0,01 NIH-yksikköä trombiinia/1 IU hyytymistekijä VIII:C:tä).

Esimerkki 1

Konstruoitiin sarja hyytymistekijä VIII:n cDNA:n deleetiojohdannaisia, jotka koodittavat kokonaan ilman B-aluetta olevia polypeptidiketjuja, mutta jotka sisältävät eri määriä emäksisiä aminohappoja, jotka liittävät raskaan ketjun karboksiterminaalisen pään kevyen ketjun aminoterminaaliseen päähän. Nämä hyytymistekijä VIII:n deleetiojohdannaisten primaariset translaatiotuotteet prosessoituvat proteolyyttisesti in vivo -olosuhteissa kahdeksi polypeptidiksi. Seuraavissa esimerkeissä tarkoittavat aminohappojen nimitykset signaalijaksoa sisältämättömässä täysimittaisessa hyytymistekijä VIII -molekyylissä olevia asemia.

Hyytymistekijä VIII:n cDNA:n mutageneesi hyytymistekijä VIII:R3 -deleetion muodostamiseksi

Hyytymistekijä VIII:n deleetiojohdannaisen (hyytymistekijä VIII:RE, M. Pasek, PCT-patenttihakemusjulkaisu nro WO88/00 831, ATCC 53517) cDNA:sta saatu 627 emäsparin suuruinen KpnI-PstI-restriktiofragmentti, joka koodittaa aminohappoja Leu 587 ja Ala 1702 ja jotka on kytketty toisiinsa täysimittaisen hyytymistekijä VIII:n Arg 740:n ja Glu 1649:n välisellä suoralla fuusiolla, vietiin bakteriofagivektoriin M13mp19 [(Yanisch-Perron, C. et al. Gene 33 (1985) 103 - 119] vakiomenetelmien mukaisesti. Oligonukleotidikohdemutageneesi [Nakamaye, K. ja Eckstein, F., Nucleic Acids. Res. 14 (1986) 9679 - 9698] suoritettiin yksinauhaisella DNA-templaatilla, joka oli valmistettu edellä kuvatusta yhdistelmä-bakteriofagista. 10 µg:n erän puhdistettua rengasmaista yksinauhaista faagi-DNA:ta annettiin liittyä yhteen pituussuunnassa 8 pikomooliin 5'-puoleisesta päästä fosforyloitua oligonukleotidia, jolla oli jakso:

5'-AACAATGCCATTGAACCAAGAAGAAGAGAAATAACTCGTACTACTCTTCAG-3'

Tulokseksi saadulla templaatilla syntetisoitiin toinen rengasmainen DNA-nauha käyttämällä seosta, joka koostui kaikista neljästä deoksinukleotidista, dCTPαS:stä, 12 yksiköstä DNA-polymeraasin Klenow-fragmenttia ja 12 yksiköstä T4-DNA-ligaasia. Kun reaktioseosta oli inkuboitu yön yli 16 °C:ssa, siitä rikastettiin kaksinauhainen DNA suodattamalla nitroselluloosan läpi 500-millimolaarisen NaCl:n läsnä ollessa. Viidesosaan puhdistetusta kaksinauhaisesta DNA:sta valmistettiin katkoksia inkuboimalla sitä 5 yksikön kanssa NciI-restriktioentsyymiä ja suorittamalla käsittely 50 yksiköllä eksonukleaasi III:a siihen asti, että faagi-DNA:n templaattinauha saatiin osittain poistumaan. Tulokseksi saatu osittainen dupleksi tehtiin kaksinauhaiseksi käsittelemällä sitä 3 tunnin ajan 16 °C:ssa 3 yksiköllä DNA-polymeraasi I:tä ja 2 yksiköllä T4-DNA-ligaasia kaikkien neljän deoksinukleotiditrifosfaatin läsnä ollessa. 300 µl kompetentteja E. coli TG1 -soluja transformoitiin yhdellä neljäsosalla saatua seosta. Kymmenelle saaduista faagiklooneista suoritettiin dideoksi-DNA-sekvenssointi [Sanger, F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463 - 5467]. Yksi sekvenssoiduista faagiklooneista sisälsi liitosjakson, jossa oli odotettu edellä kuvatun mutageenisen alukkeen mukainen nukleotidijakso. Faagi-liitosjakso koostuu siten hyytymistekijä VIII:n cDNA:n 630 emäsparin suuruisesta KpnI-PstI-fragmentista, joka koodittaa Arg 740:n ja Glu 1649:n välistä fuusiota kahden ylimääräisen Arg-ryhmän välityksellä (hyytymistekijä VIII:R3).

Hyytymistekijä VIII:R3:a koodittavan nisäkäsilmentämisvektorin konstruktio

Edellä esitetyn kuvauksen mukaista hyytymistekijä VIII:R3:a koodittava 630 emäsparin suuruinen KpnI-PstI-

fragmentti pilkottiin M13mp19-faagin DNA:n kaksinauhaisesta replikatiivisesta muodosta ja vietiin vektoriin pKGE431. Tämä vektori koostuu pUC19:ssä olevan hyytymistekijä VIII:RE:n cDNA:sta peräisin olevasta 2 046 emäsparin suuruisesta KpnI-SphI-fragmentista (M. Pasek, PCT-patenttihakemusjulkaisu nro WO88/00 831, ATCC 53517), joka koodittaa hyytymistekijä VIII:RE -proteiinin aminohappoja Leu 587 - Met 2176. Edellä esitetyn kuvauksen mukainen hyytymistekijä VIII:R3 -fuusiota koodittava 630 emäsparin suuruinen fragmentti liitettiin pKGE431:een, joka oli pilkottu täydellisesti KpnI:lla ja osittaisesti PstI:lla. Tulokseksi saatu vektori pKGE490 sisältää 2 052 emäsparin suuruisen KpnI-SphI-liitosjakson, joka koodittaa hyytymistekijä VIII:R3:n aminohappoja Leu 587 - Met 2176. pKGE490 pilkottiin KpnI:llä ja ApaI:llä ja vastaava hyytymistekijä VIII:R3 -proteiinin aminohappoja Leu 587 - Ala 2047 koodittava 1 665 emäsparin suuruinen fragmentti liitettiin ligaasilla KpnI:llä ja ApaI:llä pilkotun vektorin pKGE347 suureen fragmenttiin. Vektori pKGE347, joka perustuu E. coli -kloonausvektoriin pBR327, koostuu 741 emäsparin suuruisessa DNA-segmentissä olevasta ihmisen sytomegaloviruksen enhanseri/promoottorijaksosta [nukleotidiasemat -671 - +71, Boshart, M. et al., Cell 41 (1985) 521 - 530], joka sijaitsee vastasuuntaan hyytymistekijä VIII:QD:n cDNA:han nähden, ja se sisältää SV40:n t-antigeenin intronin ja 3'-puoleisessa päässä olevan polyadenylaatiojakson. Tulokseksi saatu vektori (pKGE491), joka on esitetty kuviossa 2, sisältää täydellisen hyytymistekijä VIII:R3:n cDNA:n ja on identtinen pKGE347:n suhteen koodittamaansa erilaista deleetiojohdannais-hyytymistekijä VIII:aa lukuun ottamatta.

Hyytymistekijä VIII:n cDNA:n mutageneesi hyytymistekijä VIII:R4 -deleetion muodostamiseksi

Edellisen kuvauksen mukainen hyytymistekijä VIII:R3:n cDNA:n osaa koodittava 630 emäsparin suuruinen KpnI-PstI-fragmentti vietiin samoilla entsyymeillä avattuun

vektoriin pUC19. Tulokseksi saadulle vektorille, jolle annettiin nimitys pKGE657, suoritettiin kohdemutageneesi käyttäen limittäisten alueiden pidentämistä polymeraasiketjureaktiolla [Ho, S.N., et al., Gene 77 (1989) 51 - 59; Saiki, R.K., et al., Science 239 (1988) 487 - 491]. Mutageneesireaktion ensimmäisessä vaiheessa järjestettiin kaksi rinnakkaiskoetta. Kokeessa nro 1 sekoitettiin 100 ng plasmidia pKGE657 1 mikromolaariseen pitoisuuteen kumpaakin seuraavista kahdesta alukkeesta:

5-ATTGAACCAAGAAGAAGAAGAGAAATAACTCGTACT-3'
5'-GATAACAATTTCACACA-3'

Tähän lisättiin lopulliseen 100 µl:n tilavuuteen seos, jonka koostumus oli 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,01 % gelatiini, 200 µM kutakin neljää deoksinukleotidiä ja 2,5 yksikköä Taq-polymeraasia. Näytteille suoritettiin 25 käsittelyjaksoa, joissa denaturaatio tapahtui 1 minuutin ajan 94 °C:ssa, liittyminen vastinnauhaan 2 minuutin ajan 50 °C:ssa ja pidentäminen 3 minuutin ajan 72 °C:ssa ja joissa käytettiin DNA Thermal Cycler -laitetta valmistajan (Perkin Elmer Cetus) ohjeiden mukaisesti. Reaktiotuotteiden analyysi agaroosigeelielektroforeesilla ja värjäys vakiomenetelmillä osoitti, että oli saatu muodostumaan yksi amplifioitu DNA-tuote, jonka pituus oli 240 emäsparia. Kokeessa nro 2 suoritettiin identtinen polymeraasiketjureaktio, jossa käytettiin seuraavia alukkeita:

5'-AGTACGAGTTATTTCTCTTCTTCTTCTTGGTTCAAT-3'
5'-GTAACGCCAGGGTTTTCC-3'

Reaktiotuotteiden analyysi agaroosigeelielektroforeesilla osoitti, että oli saatu muodostumaan yksi amplifioitu DNA-tuote, jonka pituus oli 550 emäsparia. Muta-

geneesin toisessa osassa yhdistettiin 10 µl kumpaakin edellisistä rinnakkaiskokeista saatuja tuoteseoksia kolmanteen polymeraasiketjureaktioon, jonka kokonaistilavuus oli 100 µl ja olosuhteet samat kuin edellä, paitsi että käytettiin ainoastaan kahta seuraavanlaista aluketta:

5'-GTAACGCCAGGGTTTTCC-3'
5'-GATAACAATTTCACACA-3'

Reaktioseoksen analyysi agaroosigeelielektroforeesilla osoitti, että oli saatu muodostumaan yksi amplifioitu DNA-tuote, jonka pituus oli 750 emäsparia. Tämä DNA-fragmentti pilkottiin KpnI:llä ja PstI:llä ja se liitettiin samoilla entsyymeillä avattuun pUC19:aan. Useiden tulokseksi saatujen plasmidien DNA sekvenssoitiin dideoksiryhmään päättyvän ketjun menetelmällä (Sanger et al., ks. edellä) ja plasmidille, jossa oli odotettu 633 ep:n suuruinen KpnI-PstI-fragmentti ja jonka jakso oli oikea, annettiin nimitys pKGE658. Tämä plasmidiliitosjakso koostuu siten sellaisesta hyytymistekijä VIII:R4:n cDNA:sta, joka koodittaa Arg 740:n ja Glu 1649:n välistä fuusiota kolmen Arg-ryhmän välityksellä.

Hyytymistekijä VIII:R4:ää koodittavan nisäkäsilmentämisvektorin konstruktio

Vektorista pKGE658 irrotettiin hyytymistekijä VIII:R4:n cDNA:ta koodittava 633 emäsparin suuruinen KpnI-PstI-fragmentti ja tämä vietiin vektoriin pKGE490, joka oli pilkottu täydellisesti KpnI:lla ja osittaisesti PstI:lla. Tulokseksi saatu vektori pKGE673 sisältää 2 055 emäsparin suuruisen KpnI-SphI-liitosjakson, joka koodittaa hyytymistekijä VIII:R4:n aminohappoja Leu 587 - Met 2176. pKGE673:sta irrotettiin hyytymistekijä VIII:R4:n aminohappoja Leu 587 - Ala 2047 koodittava 1 668 emäsparin suuruinen KpnI-ApaI-fragmentti ja tämä siirrettiin samoilla entsyymeillä avatun vektorin pKGE601 suureen fragment-

tiin. Vektori pKGE601, joka perustuu E. colin kloonausvektoriin pML2, koostuu 433 emäsparin suuruisen DNA-segmentin koodittamasta humaani-GRP78:n enhanseri/promoottorijaksosta [nukleotidiasemat 2 - 445, Ting, J. & Lee, A.S. DNA 7(4) (1988) 275 - 286], joka sijaitsee vastasuuntaan hyytymistekijä VIII:R5:n cDNA:han nähden, sekä SV40:n t-antigeenin intronista ja 3'-puoleisella alueella olevasta polyadenylaatiojaksosta. Tähän alueeseen nähden myötäsuuntaan on sijoitettu mouse mammary tumor -viruksen LTR-jakson ohjaama hiiren dihydrofolaattireduktaasin cDNA:ta koodittava transkriptioyksikkö, jossa on käytetty SV40:n 3'-puoleista ohjausyksikköä, joka oli sama kuin aiemmin käytössä ollut yksikkö. Tulokseksi saatu vektori pKGE674 on esitetty kuviossa 3.

Hyytymistekijä VIII:n cDNA:n mutageneesi hyytymistekijä VIII:R5 -deleetion muodostamiseksi

Vektorille pKGE 657 tehtiin limittäisten alueiden pidentämiseen perustuva kohdemutageneesi, joka oli analoginen edellisen esimerkin mukaisen hyytymistekijä VIII:R4:ää koskevan menettelyn suhteen. Ensimmäisessä kahdesta rinnakkaisesta reaktiosta käytetyt alukkeet olivat:

5'-ATTGAACCAAGAAGAAGAAGAAGAGAAATAACTCGTACT-3'
5'-GATAACAATTTCACACA-3'

Edellisen esimerkin mukaisella agaroosigeelielektroforeesilla suoritettu reaktiotuotteiden analyysi osoitti, että siinä oli muodostunut 240 emäsparin suuruinen reaktiotuote.

Toisessa kahdesta rinnakkaisesta reaktiosta käytetyt alukkeet olivat:

5'-AGTACGAGTTATTTCTCTTCTTCTTCTTCTTGGTTCAAT-3'
5'-GTAACGCCAGGGTTTTCC-3'

Agaroosigeelielektroforeesilla suoritettu reaktiotuotteiden analyysi osoitti, että oli saatu muodostumaan 550 emäsparin suuruinen reaktiotuote. Mutageneesikokeen toisessa osassa, joka oli analoginen edellisessä esimerkissä kuvatun osan suhteen, saatiin 760 emäsparin suuruinen amplifioitu DNA-tuote. KpnI:llä ja PstI:llä suoritetun pilkkomisen jälkeen tämä DNA vietiin plasmidiin pKGE490, joka oli pilkottu täydellisesti KpnI:llä ja osittaisesti PstI:llä.

Plasmidille, jolla oli 636 emäsparin suuruinen ja dideoksiryhmään päättyvien ketjujen menetelmällä suoritetun määrityksen mukaan oikean jakson omaava KpnI-PstI-fragmentti, annettiin nimitys pKGE659 ja se sisältämään kokonaisuuteen kuuluu 2 058 emäsparin suuruinen KpnI-SphI-liitosjakso, joka koostuu sellaisesta hyytymistekijä VIII:R5:n cDNA:n fragmentista, joka koodittaa Arg 740:n ja Glu 1649:n välistä fuusiota neljän ylimääräisen Arg-ryhmän välityksellä.

Hyytymistekijä VIII:R5:ä koodittavan nisäkäsilmentämisvektorin konstruktio

Hyytymistekijä VIII:R5:n aminohappoja Leu 587 - Ala 2047 koodittava 1 688 emäsparin suuruinen KpnI-ApaI-fragmentti pilkottiin pois vektorista pKGE659 ja vietiin samoilla entsyymeillä avatun pKGE601-vektorin suureen fragmenttiin käyttäen suoritustapaa, joka oli samanlainen kuin mitä oli käytetty edellä kuvatun hyytymistekijä VIII:R4:n ilmentämisvektorin pKGE674 ollessa kyseessä. Tulokseksi saatua hyytymistekijä VIII:R5:ä koodittava vektori (pKGE672) on esitetty kuviossa 4.

Esimerkki 2

Hyytymistekijä VIII:R3:a tuottavien kiinanhamsterin munasarjasolujen valmistaminen

0,5 miljoonaa dihydrofolaattireduktaasin suhteen vaillinaista kiinanhamsterin munasarjasolua (CHO-DG44, saatu Dr. L.A. Chasinilta, Columbia University, New York)

lisättiin kasvatusta varten Dulbecco's Modified Eagles Medium -kasvatusliuoksen ja Ham's F12 -kasvatusliuoksen seokseen (sekoitussuhde 1 : 1), jota oli täydennetty 10-%:isella fetaalisella vasikanseerumilla, ja niitä inkuboitiin yön yli 37 °C:ssa 5 % hiilidioksidia sisältävässä inkubaattorissa. Solut pestiin seuraavana päivänä tuoreella kasvatusliuoksella ja transfektoitiin tämän jälkeen kalsiumfosfaattimenetelmällä käyttäen 10 µg seosta, joka oli valmistettu hyytymistekijä VIII:R3 -ilmentämisvektorista pKGE491 ja dihydrofolaattireduktaasivektorista pKGE327 tällä alalla tunnettuja menetelmiä noudattaen. Vektori pKGE327 sisältää transkriptioyksikön, joka koostuu hiiren dihydrofolaattireduktaasin cDNA:han nähden vastasuuntaan sijoitetusta mouse mammary tumor -viruksen LTR-jaksosta ja vektorissa olevasta SV 40:n t-antigeenista ja 3-'puoleisessa osassa olevasta polyadenylaatiojaksosta, jotka on kloonattu myötäpäivään vektoriin pML2 (kuvio 5). Kolmantena päivänä suoritettiin kasvatusliuoksen poisto, solujen pesu ja jakaminen uusiin kasvatusmaljoihin. Neljäntenä päivänä aloitettiin dihydrofolaattireduktaasipositiivisten solujen selektio korvaamalla kasvatusliuos edellä kuvatulla kasvatusliuoksella, josta puuttuivat hypoksantiini, glysiini ja tymidiini ja jota oli täydennetty 10-%:isella perusteellisesti dialysoidulla fetaalisella vasikanseerumilla. Kasvatusliuos vaihdettiin kaksi kertaa viikossa ja dihydrofolaattireduktaasipositiivisten solujen muodostamia pesäkkeitä voitiin koota talteen noin kahden viikon kuluttua. Nämä pesäkkeet yhdistettiin ja niitä kasvatettiin vielä 25 cm^2:n soluviljelypulloissa ja kasvatusliuos korvattiin tuoreella 3 % fetaalista vasikanseerumia sisältävällä kasvatusliuoksella siinä vaiheessa, jolloin pesäkkeet eivät vielä peittäneet toisiaan. Kasvatusliuoksessa oleva hyytymistekijä VIII:C -aktiivisuus tutkittiin 24 tunnin kuluttua synteettisen substraatin menetelmällä (Coatest hyytymistekijä VIII:C, KABI-Pharmacia), jolloin

ilmentymistasoksi saatiin 80 mU/ml. Yhdistetyille dihydrofolaattireduktaasipositiivisille soluille suoritettiin geenien amplifiointi viljelemällä niitä useita viikkoja ravintoliuoksessa, joka sisälsi dihydrofolaattireduktaasi-inhibiittoria, metotreksaattia. Asteittain nousevia metotreksaattikonsentraatioita käyttäen suoritetun selektion jälkeen, jossa konsentraatio oli lopulta 500 mM, saatiin yhdistettyjä resistenttejä soluja käsittävä viljelmä, joka tuotti hyytymistekijä VIII:C:tä pitoisuudessa 1,0 U/ml pyörityslaitepulloissa.

Hyytymistekijä VIII:R4:ää tuottavien kiinanhamsterin munasarjasolujen valmistaminen

Kiinanhamsterin munasarjasolut transfektoitiin hyytymistekijä VIII:R4:ää koodittavalla ilmentämisvektorilla pKGE674 menetellen samoin kuin edellä kuvatun hyytymistekijä VIII:R3:a koodittavan ilmentämisvektorin transfektion ollessa kyseessä. Tässä tapauksessa rinnakkaistransfektio vektorilla pKGE 327 jätettiin suorittamatta, koska tässä vektorissa on selektio- ja amplifiointimarkkerina toimivaa dihydrofolaattireduktaasia koodittava transkriptioyksikkö. Sellaisessa ravintoliuoksessa suoritetun selektion jälkeen, josta puuttui hypoksantiini, glysiini ja tymiidiini, jota oli täydennetty 10-%:isella perusteellisesti dialysoidulla vasikanseerumilla ja joka oli samanlainen kuin mitä edellä oli käytetty, saatiin solukloonien yhdistelmä, joka tuotti 400 mU/ml hyytymistekijä VIII:C -aktiivisuutta Coatest-menetelmällä mitattuna. Selektio geenien amplifioimiseksi suorittamalla kloonien viljely 20 nM metotreksaatissa useiden viikkojen ajan antoi tulokseksi solujen yhdistelmän, joka tuotti 500 mU/ml hyytymistekijä VIII:C:tä. Jatkoselektiosta, joka suoritettiin viljelemällä soluja 200 nM metotreksaattia sisältävässä kasvatusliuoksessa, saatiin tulokseksi solujen yhdistelmä, joka tuotti 880 mU/ml hyytymistekijä VIII:C:tä. Nämä solut tuottivat

800 mU/ml hyytymistekijä VIII:C:tä soluviljelyn tapahduttua pyörityslaitepulloissa.

Hyytymistekijä VIII:R5:ä tuottavien kiinanhamsterin munasarjasolujen valmistaminen

Kiinanhamsterin munasarjasolut transfektoitiin edellä esitetyllä tavalla hyytymistekijä VIII:R5:ä koodittavalla ilmentämisvektorilla pKGE672, joka koodittaa sekä hyytymistekijä VIII:R5:ä että samassa plasmidissa olevia dihydrofolaattireduktaasin transkriptioyksiköitä. Sellaisessa ravintoliuoksessa suoritetun selektion jälkeen, josta puuttui hypoksantiini, glysiini ja tymiidiini ja jota oli täydennetty 10-%:isella perusteellisesti dialysoidulla vasikanseerumilla, saatiin solukloonien yhdistelmä, joka tuotti 110 mU/ml hyytymistekijä VIII:C -aktiivisuutta Coatest-menetelmällä mitattuna. Selektio geenien amplifioimiseksi solujen viljelyllä 20 nM metotreksaatissa useiden viikkojen ajan antoi tulokseksi solujen yhdistelmän, joka tuotti 1,5 U/ml hyytymistekijä VIII:C:ä pyörityslaitepulloissa.

Esimerkki 3

Hyytymistekijä VIII:R3:n, hyytymistekijä VIII:R4:n ja hyytymistekijä VIII:R5:n biokemiallinen luonnehtiminen

Esimerkissä 2 kuvattujen amplifioitujen CHO-DG44-solulinjojen yhdistelmien tuottamista hyytymistekijä VIII:R3:sta, hyytymistekijä VIII:R4:stä ja hyytymistekijä VIII:R5:stä tutkittiin niiden biokemialliset ominaisuudet. Soluviljelyliuoksesta peräisin olevan materiaalin puhdistus suoritettiin immunoaffiniteettikromatografiaa käyttäen monoklonaalisilla vasta-aineilla, jotka oli suunnattu hyytymistekijä VIII:aa vastaan, jonka jälkeen käytettiin ioninvaihtokromatografiavaihetta. Saadun materiaalin spesifinen aktiivisuus oli alueella 3 000 - 4 000 IU/A_{280} ja hyytymistekijä VIII -aktiivisuuden ja hyytymistekijä VIII -antigeenin välinen suhde oli lähes 1 (aktiivisuus määri-

tettiin Coatest-määrityksellä (KABI-Pharmacia) ja antigeeni määritettiin ELISA-määrityksellä käyttäen 80 kDa:n ketjua vastaan suunnattuja monoklonaalisia vasta-aineita).

Puhdistetuille hyytymistekijä VIII:R3:lle, hyytymistekijä VIII:R4:lle ja hyytymistekijä VIII:R5:lle tehtiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi (SDS-PAGE) ja Western-blottausanalyysi. SDS-PAGE suoritettiin menetelmällä, joka on kuvattu julkaisussa Laemmli, Nature 227 [(1970) 680 - 685]. Western-blottausanalyysiin, joka suoritettiin olennaisesti julkaisussa Towbin, H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 (1979) 4350 - 4354, kuvatulla tavalla, käytettiin aiemmin kuvattuja kaniinin polyklonaalisia humaani-hyytymistekijä VIII:aa vastaan suunnattuja vasta-aineita [Andersson, L-O., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 2979 - 2983]. Tulokset on esitetty kuviossa 6. Kanava A: plasman hyytymistekijä VIII, joka sisältää 80 kDa:n kevyen ketjun ja raskaita ketjuja, joiden massa on alueella 200 - 90 kDa. Kanava B: hyytymistekijä VIII:R3. Kanava C: hyytymistekijä VIII:R4. Kanava D: hyytymistekijä VIII:R5. Hyytymistekijä VIII:R3:ssa esiintyy vyöhykkeitä, jotka ovat 80 kDa:n, 90 kDa:n, 130 kDa:n ja 170 kDa:n kohdalla. 80 kDa:n ja 90 kDa:n vyöhykkeiden havaittiin olevan geeleissä samoissa kohdissa kuin 80 kDa:n ja 90 kDa:n peptidit, jotka edustavat pienintä biologisesti aktiivista plasman hyytymistekijä VIII:n kompleksia. 170 kDa:n vyöhyke vastaa todennäköisesti prosessoimatonta primaarista translaatiotuotetta ja 130 kDa:n kohdalla oleva vyöhyke väärällä tavalla prosessoitua hyytymistekijä VIII:R3:n muotoa. Siten ei-autenttisia polypeptidejä on myös saatu 80 kDa:n ja 90 kDa:n suuruisten ketjujen lisäksi. Hyytymistekijä VIII:R4:llä ja hyytymistekijä VIII:R5:llä esiintyy 80 kDa:n ja 90 kDa:n kohdalla olevat vyöhykkeet. Näissä mnateriaaleissa ei esiinny merkittävää määrää prosessoimatonta primaarista translaatiotuotetta (170 kDa:n ketjua). Tämä tarkoittaa

sitä, että näissä tapauksissa primaarisen translaatiotuotteen proteolyyttinen prosessointi kahdeksi polypeptidiketjuksi in vivo -olosuhteissa oli tehokasta. Siten kummassakin tapauksessa saatiin kaksiketjuinen molekyyli, jonka peptidiketjujen moolimassat vastaavat niiden ketjujen moolimassoja, jotka esiintyvät pienimmässä aktiivisessa plasman hyytymistekijä VIII:n muodossa. Lisäksi hyytymistekijä VIII:R5:n automaattisella Edman-hajotuksella määritetty N-terminaalisen jakson määritys osoitti, että 90 kDa:n ja 80 kDa:n ketjujen aminoterminaaliset päät ovat identtisiä plasmasta peräisin olevien 90 kDa:n sekä 80 kDa:n ketjut sisältävän hyytymistekijä VIII:n päihin verrattuna.

Kuvioissa 7 ja 8 on esitetty aktivointikäyrä ja SDS-PAGE/Western-blottaustulokset, jotka on saatu hyytymistekijä VIII:R5:n inkuboinnista trombiinin kanssa (trombiinia lisättiin 0,01 U kutakin hyytymistekijä VIII -yksikköä kohti). Reaktioseoksesta saadut näytteet analysoitiin välittömästi yksivaiheisella hyytymän muodostumismenetelmällä. [Mikaelsson, M. et al., Blood 62 (1983) 1006 - 1015.] 17-kertainen aktivoituminen saatiin tapahtumaan kahdessa minuutissa, mitä seurasi inaktivoituminen. Näytteissä olevan reaktion pysäyttämiseksi lisättiin natriumdodekyylisulfaattia pitoisuuteen 0,02 g/ml SDS/PAGE-Western-blottausanalyysin suorittamiseksi. Elektroforeesi ja Western-blottausanalyysi suoritettiin reaktioseoksesta aikavälein otetuista näytteistä kuviota 6 koskevan kuvauksen mukaisesti. Saadut tulokset osoittivat sen, että hyytymistekijä VIII -peptidien molekyyleissä tapahtuva muutos trombiinin kanssa suoritetun inkuboinnin aikana on identtinen plasman hyytymistekijä VIII:n muutoksen kanssa. Siten 90 kDa:n peptidi pilkkoutui trombiinilla, jolloin muodostuivat 50 kDa:n ja 40 kDa:n peptidit. 80 kDa:n peptidi pilkkoutui ja muodosti 70 kDa:n peptidin. Trombiinilla tehdyt tutkimukset osoittivat, että vuorovaikutuksessa tämän entsyymin kanssa hyytymistekijä VIII:

R5 käyttäytyy plasman hyytymistekijä VIII:n tavoin. Tämän piirteen katsotaan olevan olennainen biologiselle aktiivisuudelle in vivo -olosuhteissa.

Hyytymistekijä VIII:R5:n vuorovaikutusta ihmisen von Willebrand -tekijän kanssa tutkittiin käyttämällä molekyylikoon mukaisesti rajaavaa kromatografiaa Sepharose CL-6B:ssa. Kymmenen (10) IU hyytymistekijä VIII:R5:ä ja 30 U puhdistettua ihmisen von Willebrand -tekijää inkuboitiin keskenään 37 °C:ssa 20 minuutin ajan. Inkubointiseos pipetoitiin tämän jälkeen Sepharose CL-6B:llä pakattuun pylvääseen. Kaikki se materiaali, jossa oli hyytymistekijä VIII -aktiivisuutta, eluoitui ulkoisessa tilavuudessa von Willebrand -tekijän mukana. Kun pylvääseen pipetoitiin hyytymistekijä VIII:R5:ä von Willebrand -tekijää lisäämättä, niin hyytymistekijä VIII -aktiivisuutta sisältävä materiaali eluoitui ainoastaan sisäisen tilavuuden fraktioissa kohdalla, jossa myös eluoitui plasman hyytymistekijä VIII:n 90 - 80 kDa:n muoto. Tämä tulos osoittaa, että hyytymistekijä VIII:R5:llä on kyky sitoutua von Willebrand -tekijään, mikä on hyvään säilymiseen in vivo -olosuhteissa tarvittava ominaisuus [Brinkhous, K.M., el al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 8752 - 8756].

Tämän keksinnön mukaiset hyytymistekijä VIII -johdannaiset on talletettu talletuslaitokseen Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen 13.3.1991. Tämän mukaisesti hyytymistekijä VIII:R3:lle on annettu hakunumero DSM 6415, hyytymistekijä VIII:R4:lle on annettu hakunumero DSM 6417, ja hyytymistekijä VIII:R5:lle on annettu hakunumero DSM 6416.

Patenttivaatimukset:

1. Biologisesti aktiivista yhdistelmä-humaani-hyytymistekijä VIII -johdannaista koodittava DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että se käsittää ensimmäisen DNA-segmentin, joka koodittaa humaani-hyytymistekijä VIII:n aminohappoja 1 - 740, ja toisen DNA-segmentin, joka koodittaa humaani-hyytymistekijä VIII:n aminohappoja 1649 - 2332, ja mainitut segmentit on yhdistetty kytkijä-DNA-segmentillä, joka koodittaa lysiinistä tai arginiinista koostuvaa ainakin kolmen tai korkeintaan noin kymmenen aminohapon mittaista kytkijäpeptidiä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että kytkijä-DNA-segmentti koodittaa kolmea tai neljää aminohapporyhmää.

3. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että kytkijä-DNA-segmentti koodittaa kolmea tai neljää aminohapporyhmää ja että Glu-1649:ää edeltävä aminohapporyhmä on arginiini.

4. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että kytkijä-osan kaikki ryhmät ovat arginiiniryhmiä.

5. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että kytkijä-DNA-segmentti koodittaa kolmea tai neljää aminohapporyhmää, jotka ovat arginiineja.

6. Yhdistelmä-ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää transkriptioyksikön, joka käsittää minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukaisen DNA-jakson, transkriptiossa käytettävän promoottorin ja polyadenylaatiojakson.

7. Eläimestä peräisin oleva isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on transformoitu patenttivaatimuksen 6 mukaisella yhdistelmä-ilmentämisvektorilla.

8. Menetelmä minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 5 mukaisen DNA-jakson ilmentämän biologisesti aktiivisen yhdistelmä-humaani-hyytymistekijä VIII:n johdannaisen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että viljellään eläinsolulinjaa, joka on transfomoitu yhdistelmä-ilmentämisvektorilla, joka sisältää transkriptioyksikön, joka sisältää mainitun DNA-jakson, transkriptiossa käytettävän promoottorin ja polyadenylaaatiojakson ravintoalustassa, joka mahdollistaa sellaisen humaanihyytymistekijä VIII:n johdannaisen ilmentämisen ja erittämisen, joka koostuu kahdesta, 90 kDa:n ja 80 kDa:n suuruisesta polypeptidistä, jotka ovat liittyneet yhteen metalli-ionisidoksella, ja mainittu johdannainen otetaan talteen soluviljelyalustasta.

Patentkrav

1. DNA-sekvens, vilken kodar för ett biologiskt aktivt rekombinant human-faktor-VIII-derivat, k ä n n e t e c k n a d av att den omfattar ett första DNA-segment, som kodar för aminosyrorna 1 - 740 av human-faktor-VIII och ett andra DNA-segment, som kodar för aminosyrorna 1649 - 2332 av humanfaktor VIII, och nämnda segment är sammanfogade med ett länkande DNA-segment, vilket kodar för en länkande peptid med åtminstone tre och högst ca 10 aminosyragrupper, vilka valts bland lysin och arginin.

2. DNA-sekvens enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d av, att det länkande DNA-segmentet kodar för tre eller fyra aminosyragrupper.

3. DNA-sekvens enligt något av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a d av, att det länkande DNA-segmentet kodar för tre eller fyra aminosyragrupper och att aminosyragruppen som föregår Glu-1649 är arginin.

4. DNA-sekvens enligt något av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a d av, att samtliga aminosyragrupper i nämnda länkdel är arginin.

5. DNA-sekvens enligt något av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a d av, att det länkande DNA-segmentet kodar för tre eller fyra aminosyragrupper bestående av arginin.

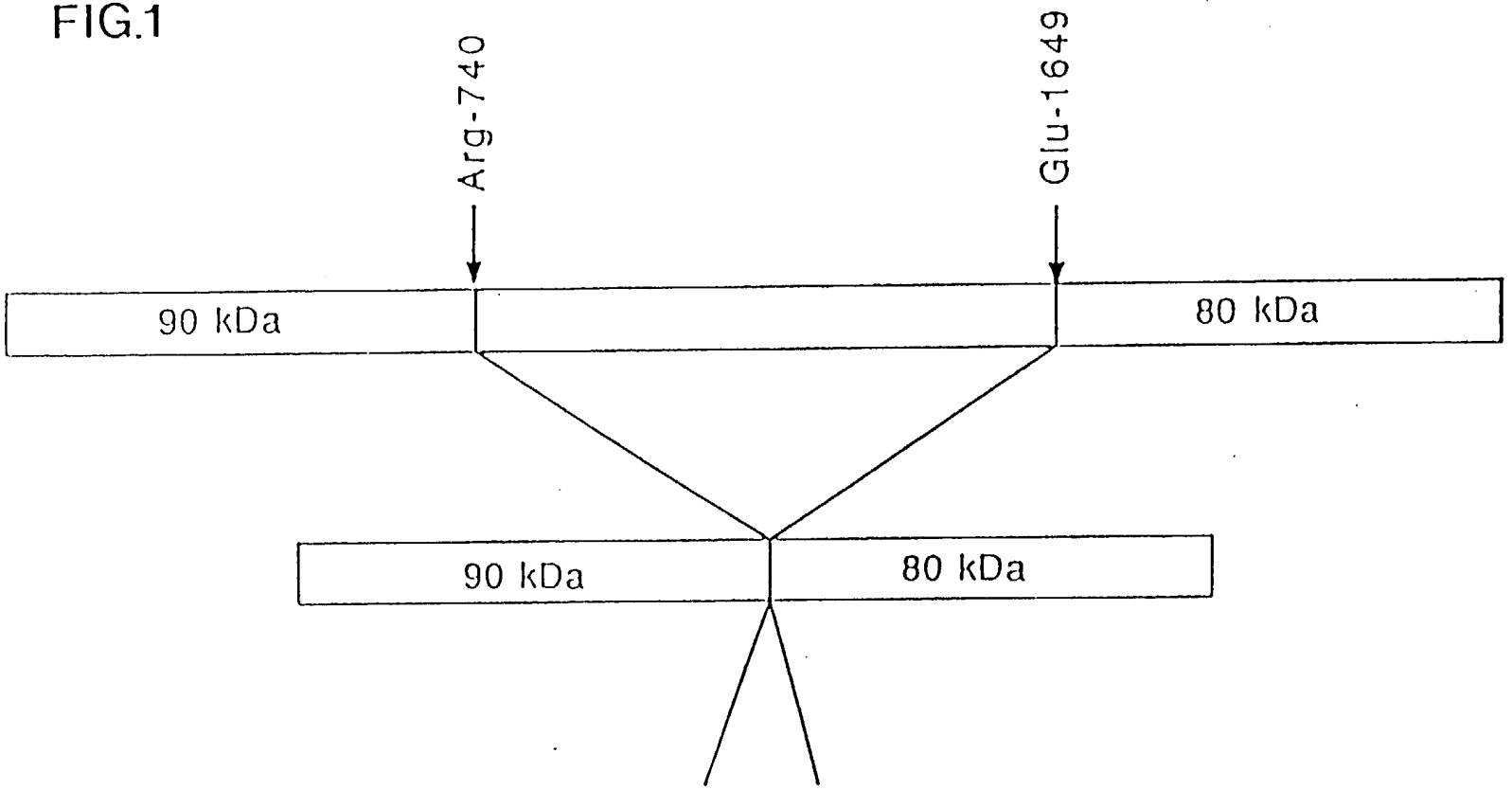
6. Rekombinant expressionsvektor, k ä n n e t e c k n ad därav, att den omfattar en transkriptionsenhet, vilken innehåller DNA-sekvensen enligt något av föregående patentkrav, en transkriptionspromoter och en polyadenyleringssekvens.

7. Värdcell av animalt ursprung, k ä n n e t e c k n a d därav, att den transformerats med den rekombinanta expressionsvektorn enligt patentkrav 6.

8. Förfarande för framställning av ett biologiskt aktivt rekombinant human-faktor-VIII-derivat, exprimerat

av en DNA-sekvens enligt något av patentkraven 1 - 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att man odlar en animal cellinje, vilken transformerats med en rekombinant expressionsvektor, som innehåller en transkriptionsenhet, som innehåller nämnda DNA-sekvens, en transkriptionspromotor och en polyadenyleringssekvens i ett näringsmedium, vilket tillåter exprimering och utsöndring av ett human-faktor-VIII-derivat, vilket består av två polypeptider med molekylvikter av 90 kDa respektive 80 kDa förenade med varandra genom en metalljonbindning, och tillvaratar nämnda derivat från cellodlingsmediet.

FIG.1



HYYTYMISTEKIJÄ VIII:R3 IleGluProArgArgArgGluIleThr

HYYTYMISTEKIJÄ VIII:R4 IleGluProArgArgArgArgGluIleThr

HYYTYMISTEKIJÄ VIII:R5 IleGluProArgArgArgArgArgGluIleThr

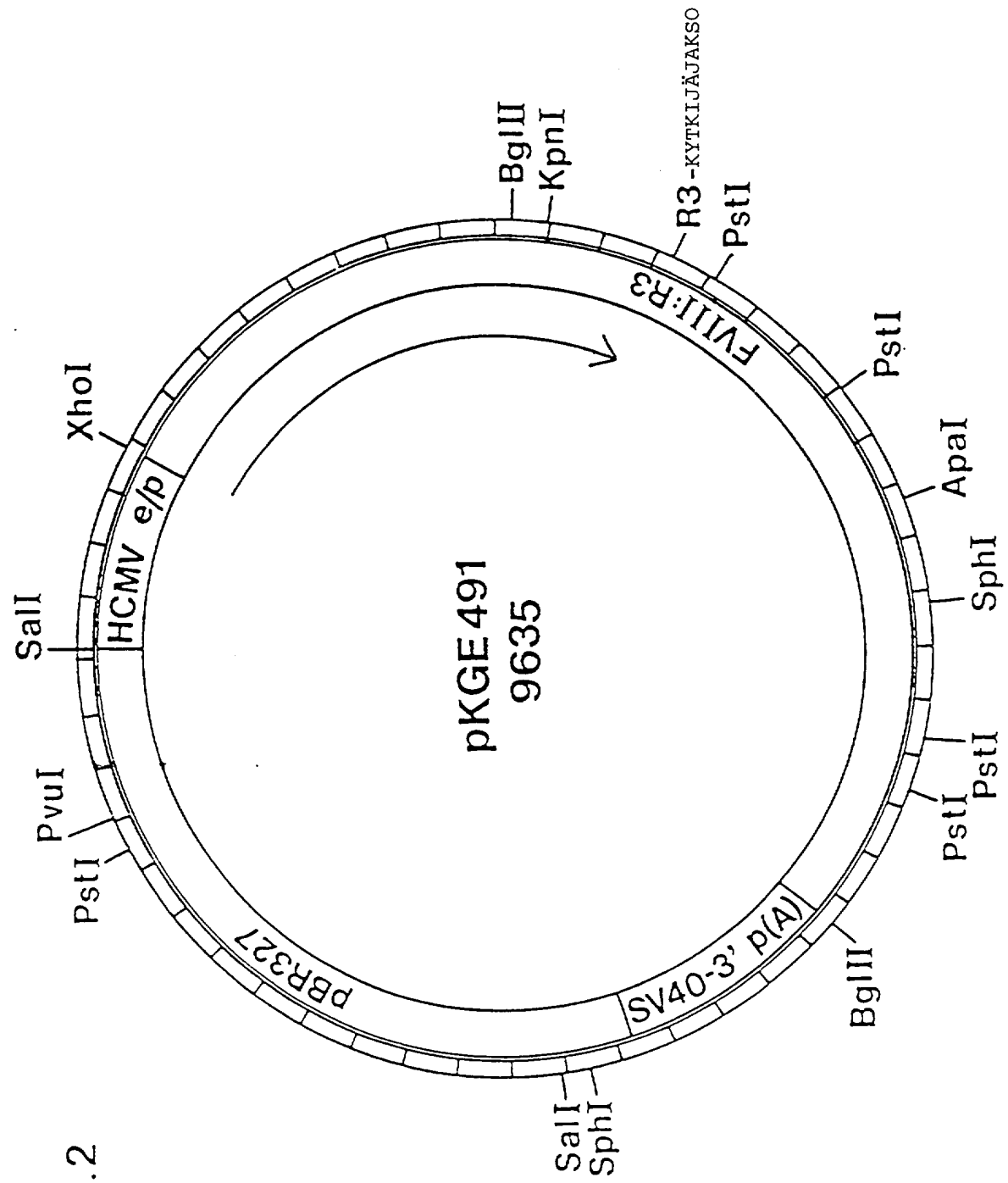

pKGE491
9635
HCMV e/p
FVIII:R3
R3-KYTKIJÄJAKSO
SV40-3' p(A)
pBR327
XhoI
SalI
PvuI
PstI
BglII
KpnI
PstI
PstI
ApaI
SphI
PstI
BglII
SalI
SphI

FIG.2

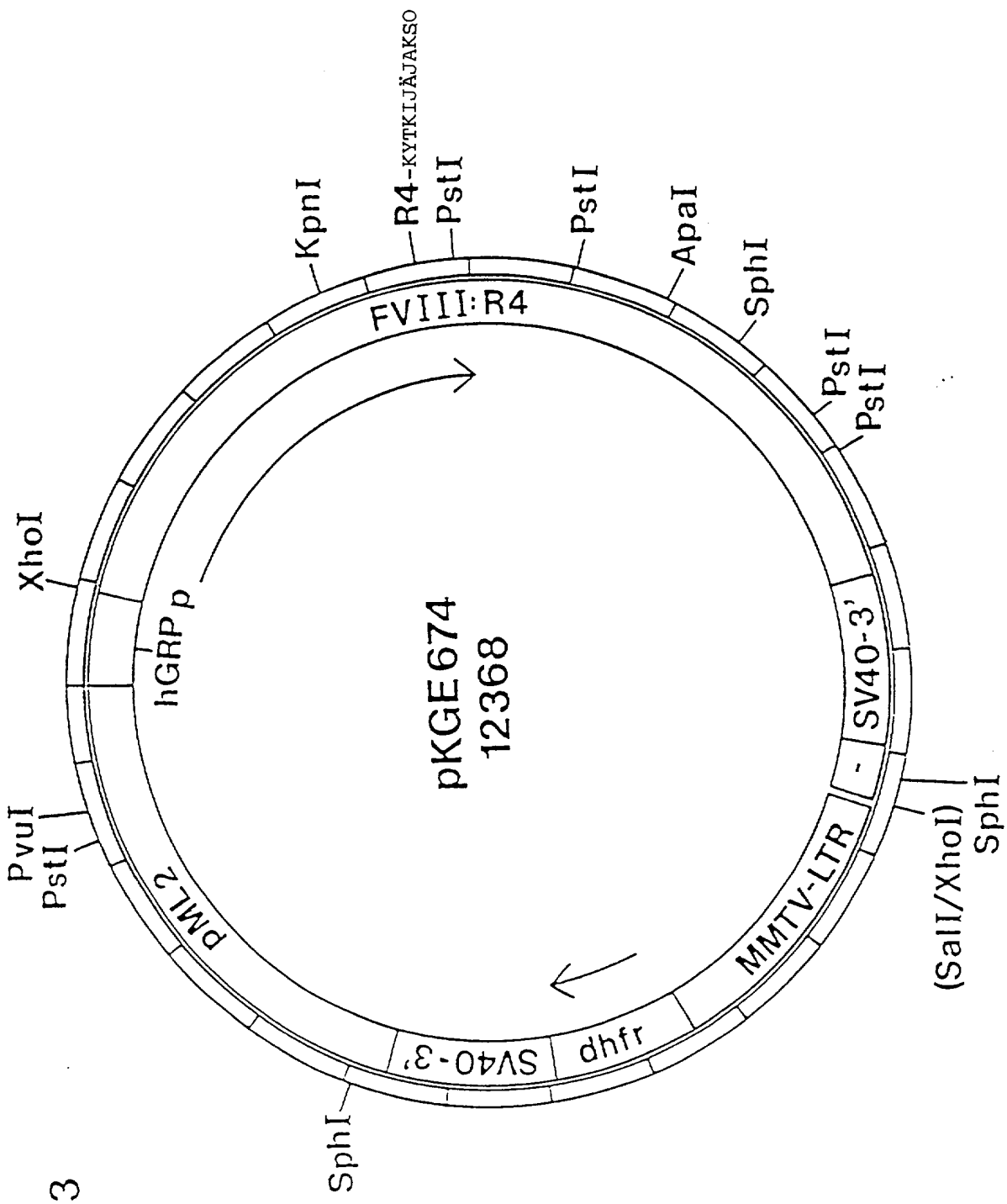

pKGE674
12368
FVIII:R4
hGRP p
R4-KYTKIJÄJAKSO
KpnI
PstI
PstI
ApaI
SphI
PstI
PstI
XhoI
PvuI
PstI
pML 2
SV40-3'
dhfr
MMTV-LTR
-
SV40-3'
(SalI/XhoI)
SphI
SphI

FIG.3

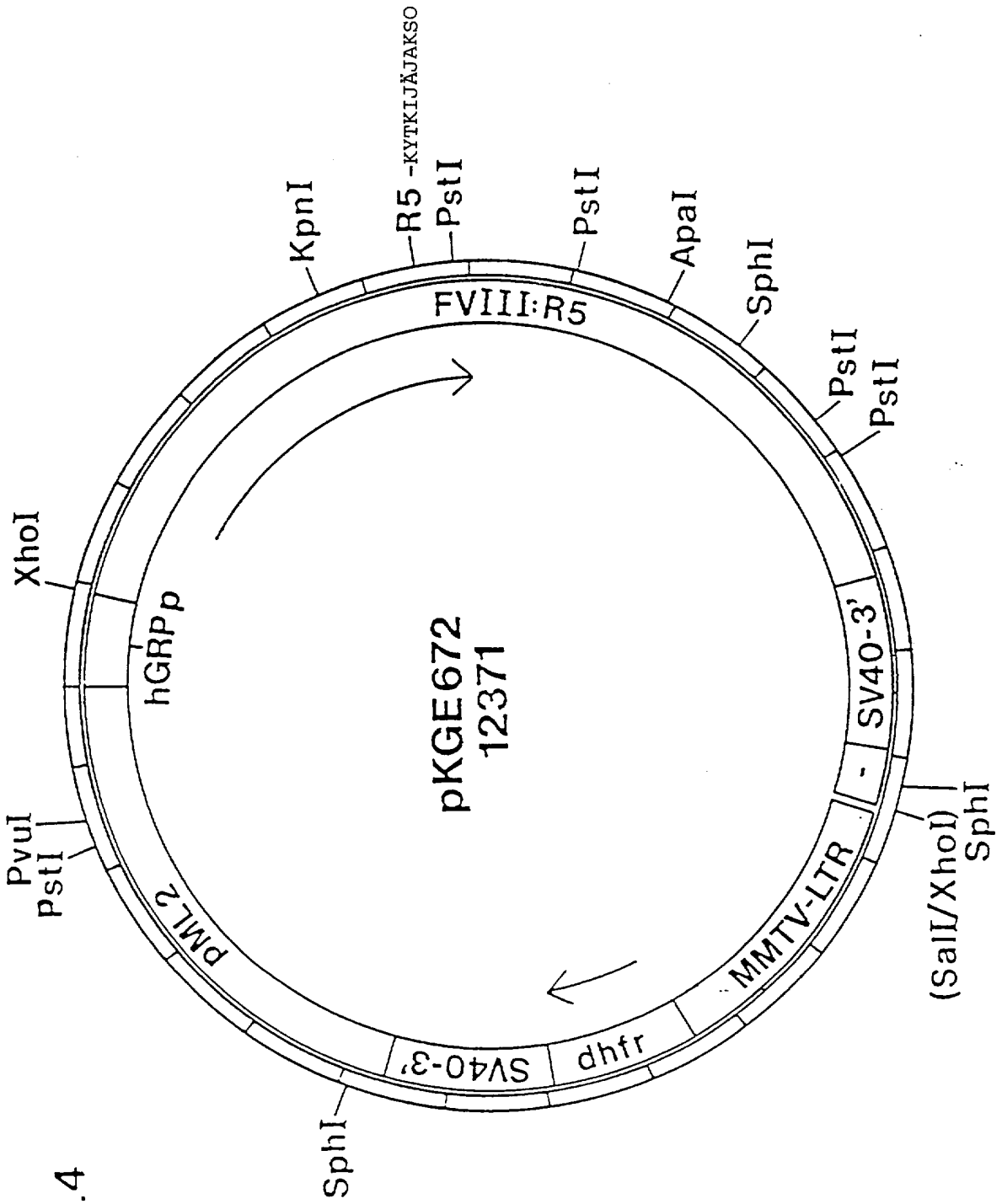

pKGE672
12371
FVIII:R5
hGRPp
pML 2
dhfr
SV40-3'
MMTV-LTR
SV40-3'
R5 -KYTKIJÄJAKSO
KpnI
PstI
PstI
ApaI
SphI
PstI
PstI
XhoI
PvuI
PstI
SphI
(SalI/XhoI)
SphI

FIG.4

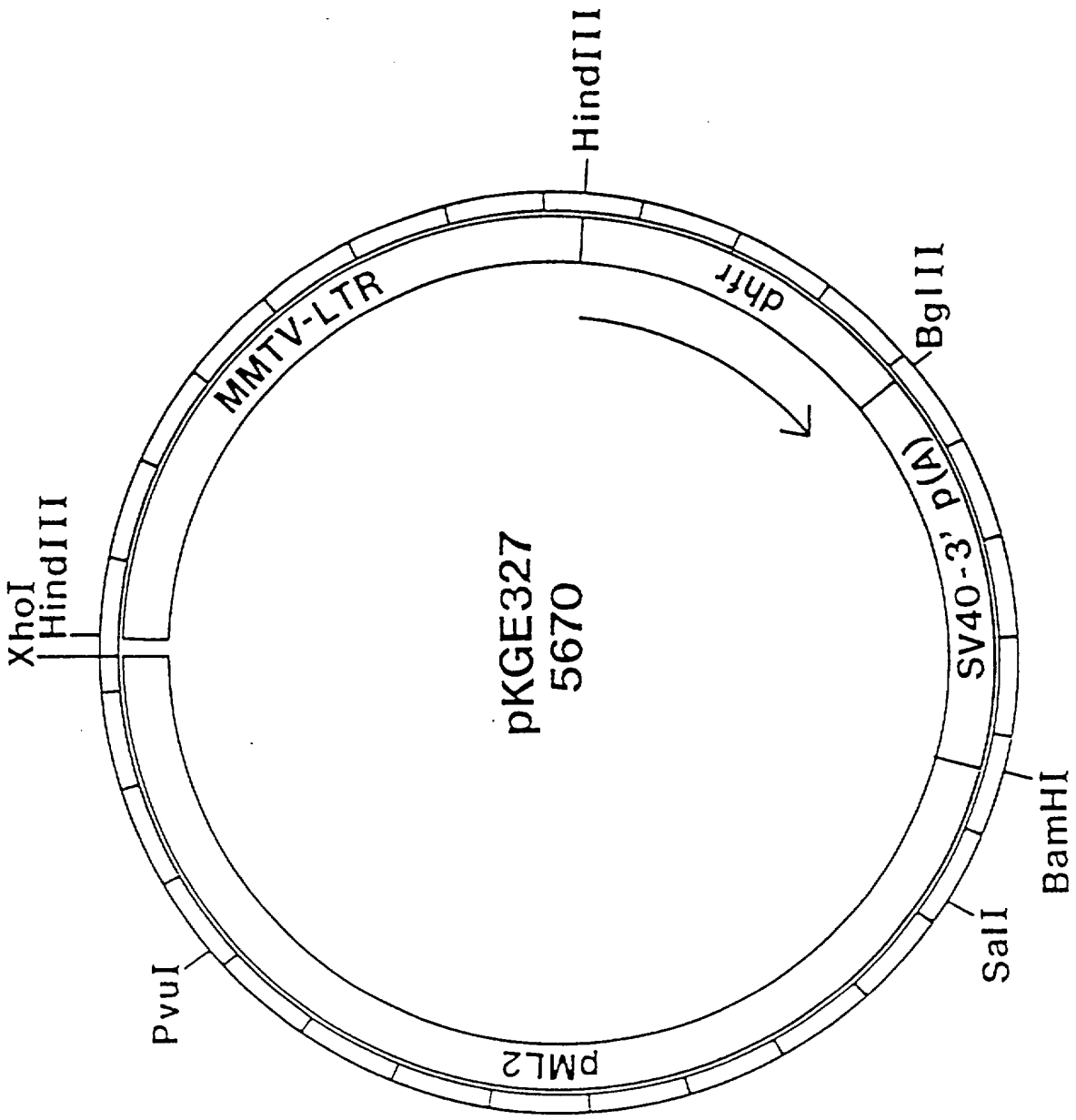

HindIII
BglII
SV40-3' p(A)
BamHI
SalI
pML2
PvuI
XhoI
HindIII
MMTV-LTR
dhfr
pKGE327
5670

FIG.5

FIG.6

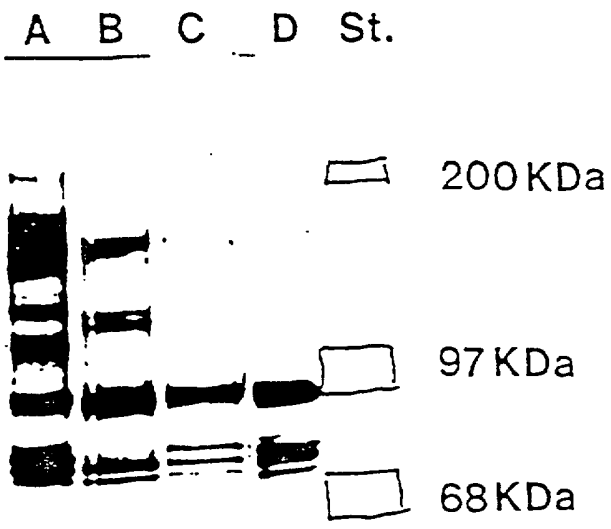
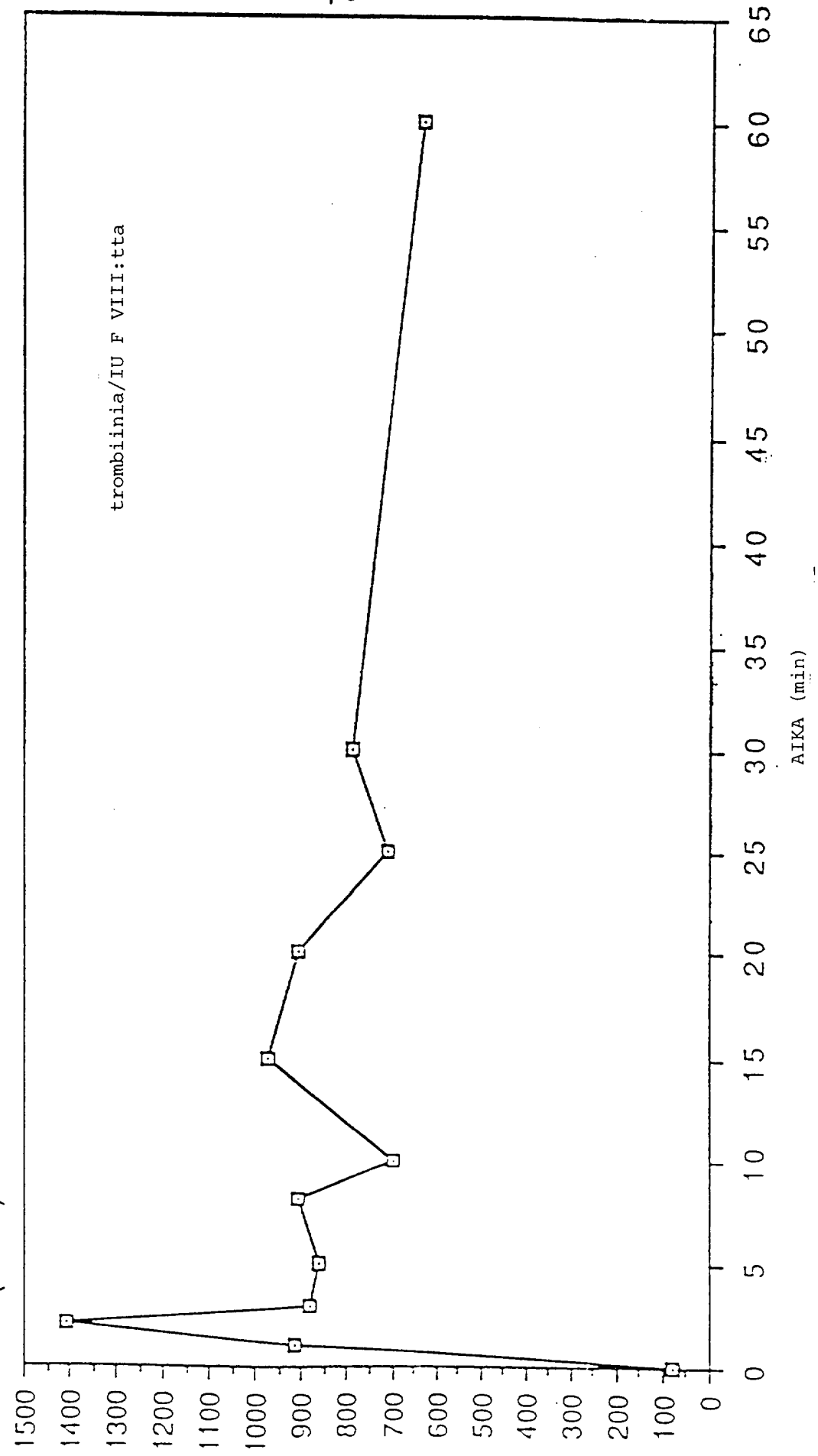


FIG.7


RFVIII:R5:n aktivoituminen trombiinilla
trombiinia/IU F VIII:tta
F VIII:C (IU/ml)
1500
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
AIKA (min)

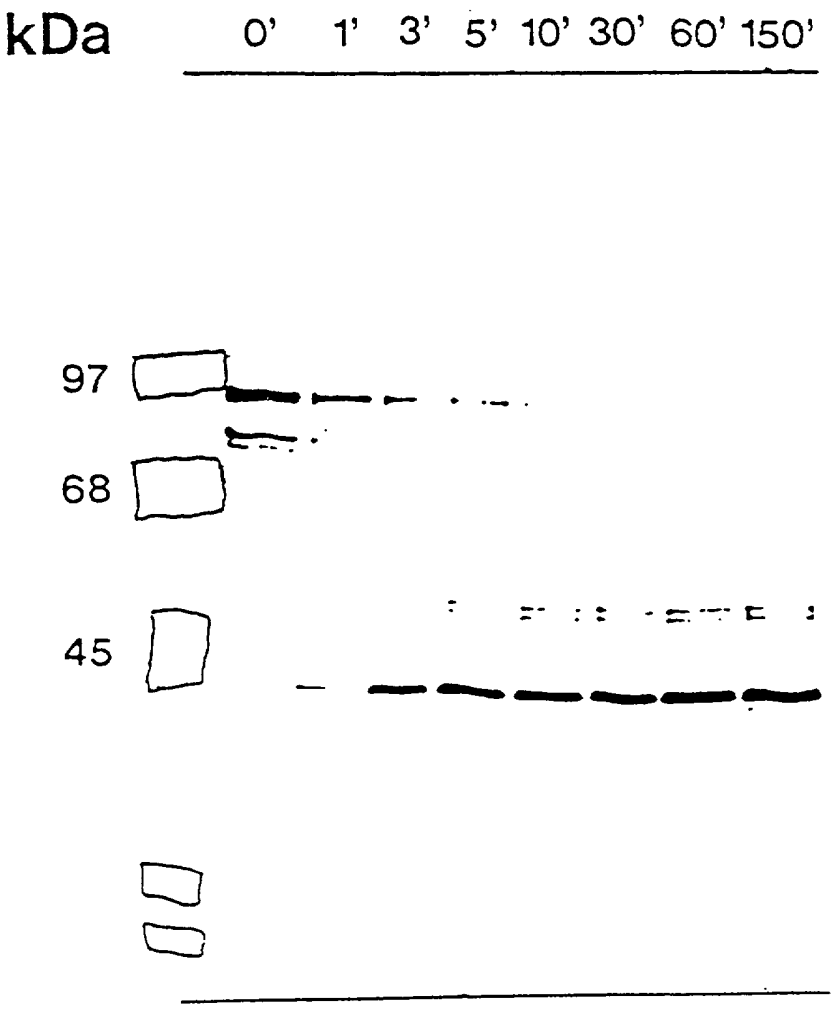



FIG.8